

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

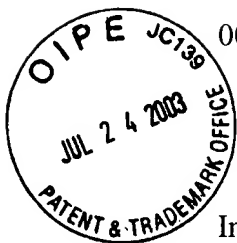
Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

#21
1632
DD
9-25-03



00766.000044

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:)
YOSHIKI SASAI, ET AL.) Examiner: Thaiann Ton
Application No.: 09/855,587) Group Art Unit: 1632
Filed: May 16, 2001)
For: NOVEL DIFFERENTIATION)
INDUCING PROCESS OF)
PROCESS OF EMBRYONIC STEM)
CELL TO ECTODERMAL CELL)
AND ITS USE) July 23, 2003

RECEIVED
JUL 25 2003
TECH CENTER 1600/2900

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

CLAIM TO PRIORITY

Sir:

Further to Applicants' July 16, 2003 Amendment, Applicants hereby claim priority under the International Convention and all rights to which they are entitled under 35 U.S.C. § 119 based upon the following Japanese Priority Applications:

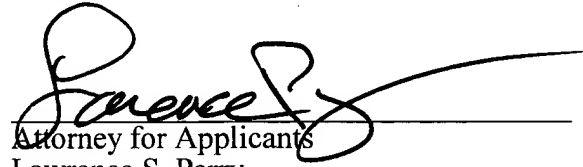
A certified copy of the priority documents are enclosed.

Application No. 2000-290819 filed September 25, 2000

Application No. 2000-144059 filed May 16, 2000

Applicants' undersigned attorney may be reached in our New York office by telephone at (212) 218-2100. All correspondence should continue to be directed to our address given below.

Respectfully submitted,



Attorney for Applicants
Lawrence S. Perry
Registration No. 31,865

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
Facsimile: (212) 218-2200

NY_MAIN 364448v1

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application: 2000年 9月25日

出 願 番 号

Application Number: 特願2000-290819

[ST.10/C]:

[JP2000-290819]

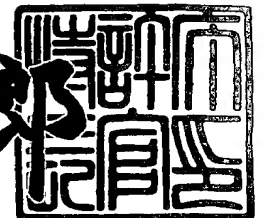
出 願 人

Applicant(s): 協和醗酵工業株式会社

2003年 6月13日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3046367

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-34670-1

【提出日】 平成12年 9月25日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 5/02

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区聖護院河原町 5 3 番地 京都大学再生医科学研究所内

【氏名】 笹井 芳樹

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区吉田近衛町 京都大学医学部分子遺伝学教室内

【氏名】 西川 伸一

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100105647

【弁理士】

【氏名又は名称】 小栗 昌平

【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】

【識別番号】 100105474

【弁理士】

【氏名又は名称】 本多 弘徳

【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】

【識別番号】 100108589

【弁理士】

【氏名又は名称】 市川 利光

【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】

【識別番号】 100115107

【弁理士】

【氏名又は名称】 高松 猛

【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】

【識別番号】 100090343

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗宇 百合子

【電話番号】 03-5561-3990

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2000-144059

【出願日】 平成12年 5月16日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 092740

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 胚性幹細胞の外胚葉系細胞への新規な分化誘導法及びその用途

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程を含む、胚性幹細胞を外胚葉細胞に分化誘導する方法。

【請求項 2】 外胚葉細胞が、神経系細胞または表皮系細胞に分化しうる能力を有している細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程を含む、胚性幹細胞を外胚葉由来の細胞に分化誘導する方法。

【請求項 4】 外胚葉由来の細胞が、神経系細胞または表皮系細胞である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 表皮系細胞が表皮細胞である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 骨形成因子 4 (Bone Morphogenetic Protein 4) 存在下で培養することを特徴とする、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】 神経系細胞が神経幹細胞または神経細胞である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】 神経細胞が、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれる神経細胞である、請求項 7 に記載の方法。

- (a) ドーパミン作動性神経細胞；
- (b) アセチルコリン作動性神経細胞；
- (c) γ アミノ酪酸作動性神経細胞；
- (d) セロトニン作動性神経細胞。

【請求項 9】 非凝集状態が、エンブリオイドボディを介さない状態である、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】 無血清培養の条件下で培養する工程を含むことを特徴とする、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】 ストローマ細胞由来の因子の存在下で培養することを特徴とする、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】 ストローマ細胞存在下で培養することを特徴とする、請求

項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3】 ストローマ細胞が、物理化学的处理により増殖能力を失ったストローマ細胞である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】 物理化学的处理が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる処理である、請求項 1 3 に記載の方法。

- (a) 抗癌剤による処理；
- (b) 放射線の照射による処理；
- (c) 病理診断で用いられる組織固定のための処理。

【請求項 1 5】 抗癌剤が、マイトマイシン C、5-フルオロウラシル、アドリマイシン、アラ C 及びメトトレキセートからなる群から選ばれる抗癌剤である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】 病理診断で用いられる組織固定のための処理が、マイクロウェーブ固定、急速凍結置換固定、グルタルアルデヒド固定、パラフォルムアルデヒド固定、ホルマリン固定、アセトン固定、ブアン固定、過ヨウ素酸固定、メタノール固定及びオスミウム酸固定からなる群から選ばれる処理である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】 ストローマ細胞が、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 及び (g) からなる群から選ばれるストローマ細胞である、請求項 1 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

- (a) 胎児初代培養繊維芽細胞；
- (b) S I H M マウス由来 S T O 細胞；
- (c) マウス胎児由来 N I H / 3 T 3 細胞；
- (d) M - C S F 欠損マウス頭蓋冠由来 O P 9 細胞；
- (e) マウス頭蓋冠由来 M C 3 T 3 - G 2 / P A 6 細胞；
- (f) 胚性幹細胞由来のストローマ細胞；
- (g) 骨髓間葉系幹細胞由来のストローマ細胞。

【請求項 1 8】 胚性幹細胞が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる細胞である、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

- (a) 着床以前の初期胚を培養することによって樹立した胚性幹細胞；

(b) 体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を培養することによって樹立した胚性幹細胞；

(c) (a) 又は (b) の胚性幹細胞の染色体上の遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて改変した胚性幹細胞。

【請求項19】 培養工程にレチノイン酸を添加しないことを特徴とする、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】 胚性幹細胞を外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞に分化誘導する効率が5%以上である、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】 実質的に中胚葉系細胞の分化誘導を伴わない、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】 請求項1～21のいずれか1項に記載の方法で用いる、胚性幹細胞を外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導するための培地。

【請求項23】 骨形成因子4 (Bone Morphogenetic Protein 4) を有効成分として含有する、外胚葉細胞の表皮系細胞への分化誘導剤。

【請求項24】 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有するストローマ細胞または該細胞由来の因子を有効成分として含む、胚性幹細胞の外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞への分化誘導剤。

【請求項25】 ストローマ細胞が、請求項13～17のいずれか1項に記載のストローマ細胞である、請求項24記載の分化誘導剤。

【請求項26】 ストローマ細胞由来の因子がムコ多糖吸着能を有する、請求項24又は25記載の分化誘導剤。

【請求項27】 ムコ多糖がヘパリンである、請求項26記載の分化誘導剤。

【請求項28】 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有するストローマ細胞を、ムコ多糖を含む培地中で培養して得られる培養上清。

【請求項29】 ストローマ細胞が、請求項13～17のいずれか1項に記載のストローマ細胞である、請求項28に記載の培養上清。

【請求項30】 ムコ多糖がヘパリンである、請求項28又は29記載の培

養上清。

【請求項 3 1】 請求項 2 8 ～ 3 0 のいずれか 1 項に記載の培養上清を有効成分として含む、外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞の分化誘導剤。

【請求項 3 2】 ストローマ細胞を免疫原として用いることを特徴とする、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有するストローマ細胞を特異的に認識する抗体を取得する方法。

【請求項 3 3】 ストローマ細胞が、請求項 1 3 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 3 4】 請求項 3 2 または 3 3 に記載の方法により取得される、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞を特異的に認識する抗体。

【請求項 3 5】 請求項 3 4 に記載の抗体を用いることを特徴とする、該抗体が認識する抗原を取得する方法。

【請求項 3 6】 請求項 3 5 に記載の方法により取得される、請求項 3 4 に記載の抗体が認識する抗原。

【請求項 3 7】 請求項 3 6 に記載の抗原を含む細胞培養のための培地。

【請求項 3 8】 請求項 1 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法を用いることによって誘導される、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞。

【請求項 3 9】 請求項 3 8 に記載の外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を、抗癌剤を含む培地中で培養する工程を含むことを特徴とする、胚性幹細胞から分化誘導された細胞の純度を高める方法。

【請求項 4 0】 抗癌剤が、マイトマイシン C、5 - フルオロウラシル、アドリアマイシン、メトトレキセート及びアラ C からなる群から選ばれる抗癌剤である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】 請求項 3 9 または 4 0 に記載の方法を用いて得られる、細胞。

【請求項 4 2】 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求項 1 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法を行い、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程を比較

することを特徴とする、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程における調節に関連する物質の評価方法。

【請求項 4 3】 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求項 1 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法を行い、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程を比較することを特徴とする、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程における調節に関連する物質のスクリーニング方法。

【請求項 4 4】 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求項 3 8 に記載の細胞を培養し、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能を比較することを特徴とする、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能の調節に関連する物質の評価方法。

【請求項 4 5】 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求項 3 8 に記載の細胞を培養し、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能を比較することを特徴とする、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能の調節に関連する物質のスクリーニング方法。

【請求項 4 6】 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞または該細胞由来の因子を含む医薬。

【請求項 4 7】 ストローマ細胞が、請求項 1 3 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、請求項 4 6 記載の医薬。

【請求項 4 8】 請求項 3 4 に記載の抗体を含む医薬。

【請求項 4 9】 請求項 3 6 に記載の抗原を含む医薬。

【請求項 5 0】 請求項 3 8 に記載の外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を含む、医薬。

【請求項 5 1】 請求項 4 1 に記載の細胞を含む医薬。

【請求項 5 2】 外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の診断、予防および／または治療のための医薬である、請求項 4 6 ～ 5 1 のいずれか 1 項に記載の医薬。

【請求項 5 3】 外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患が、神経系細胞または表皮系細胞の障害に基づく疾患である、請求項 5 2 に記載の医薬。

【請求項 54】 神経系細胞の障害に基づく疾患が、アルツハイマー病、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、虚血性脳疾患、てんかん、脳外傷、背堆損傷、運動神経疾患、神経変性疾患、網膜色素変性症、内耳性難聴、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、または神経毒物の障害に起因する疾患であり、表皮系細胞の障害に基づく疾患が火傷、外傷、創傷治癒、床擦れ、または乾せんである、請求項 53 に記載の医薬。

【請求項 55】 請求項 34 に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項 36 に記載の抗原の免疫学的検出法。

【請求項 56】 請求項 34 に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項 36 に記載の抗原の免疫組織染色法。

【請求項 57】 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を指標に、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞へ分化誘導する活性を有するストローマ細胞由来の因子を取得する方法。

【請求項 58】 ムコ多糖とストローマ細胞由来の因子を結合させる工程と、ムコ多糖に結合した該ストローマ細胞由来の因子から該因子を回収する工程を含む、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】 ストローマ細胞が、請求項 13～17 のいずれかに記載のストローマ細胞である、請求項 57 または 58 に記載の方法。

【請求項 60】 ムコ多糖が、ヘパリンである、請求項 58 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、胚性幹細胞から機能性細胞を分化誘導する方法に関する。さらに詳細には、本発明は、細胞医療として有用な外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を胚性幹細胞から分化誘導する方法、該分化誘導した細胞、並びにそれら用途に関する。本発明はまた、上記方法で用いる培地、上記方法で用いるストローマ細胞を特異的に認識する抗体、該抗体が認識する抗原、並びにそれら用途にも関する。

【0002】

【従来の技術】

通常、胚幹細胞 (embryonic stem cell) とは、インビトロにおいて培養することが可能で、かつ、他の個体の着床以前の胚、例えば、胚盤胞腔中に注入すると生殖細胞をも含むすべての細胞に分化できる細胞のことを意味しており、胚性幹細胞あるいはES細胞とも呼ばれている。

【0003】

初期胚の発生と胚性幹細胞の関係をマウスを例として以下に説明する。

マウス受精卵は、卵管から子宮に向かって移動しながら2細胞、4細胞、8細胞と分裂を行い16細胞期になった時点で細胞間の接着が強まるコンパクション (compaction) が起こり、細胞間の境界が不明瞭になった桑実胚 (morula) と呼ばれる段階に至る。さらに、受精後3.5日には、胚内部に割腔 (blastocoel) と呼ばれる空間ができ胚盤胞 (blastocyst) になる。このとき胚盤胞は外側の栄養外胚葉 (trophectoderm) 層と内部細胞塊 (inner cell mass: ICM) から構成されている。胚盤胞は受精後4.5～5.5日にかけて子宮壁に着床する。着床の時期には、内部細胞塊の中で割腔に面した表面の細胞が原始内胚葉 (primitive endoderm) 細胞に分化している。これらのうち、一部の細胞は胚本体から離れ栄養外胚葉層の中側へ遊走し遠位内胚葉 (parietal endoderm) 細胞となり、細胞外マトリックスを分泌してライヘルト膜 (Reichert's membrane) をつくる。

【0004】

一方、胚体部分近くの原始内胚葉細胞は近位内胚葉 (visceral endoderm) と呼ばれる細胞層をつくる。これら遠位および近位内胚葉は、やがて胎児本体を保護して栄養物や老廃物を母体との間で交換するための支持組織となる。将来胎児本体をつくる内部細胞塊の細胞は増殖して原始外胚葉 (primitive ectoderm) と呼ばれる細胞層をつくる。原始外胚葉は、胚性外胚葉 (embryonic ectoderm) あるいは上葉細胞層 (epiblast) とも呼ばれている。着床後の胚は全体として円筒形に成長するため、受精後5.5～7.5日の胚は卵筒胚 (egg cylinder) と呼ばれる。卵筒胚の子宮との付け根側半分には、将来胎盤をつくる胚体外組織 (extraembryonic tissue) が栄養外胚葉から分化し形成されている。受精後6.5日には原始外胚葉層に原条 (primitive streak) と呼ばれる溝が現れ、この部分で原

始外胚葉が間充細胞様に変化して原始外胚葉層と近位内胚葉層との間に入り込み、原条から左右および前後方向に移動して胚性中胚葉細胞層 (embryonic mesoderm) を形成する。この細胞層の中には、将来胎児本体の内胚葉 (definitive endoderm) になる細胞も含まれている。

【0005】

このように、原始外胚葉からは外胚葉のみならず、胎児の中胚葉および内胚葉の3胚葉が作られることが明らかにされており、胎児のすべての組織は原始外胚葉由来であることが示されている。なお、神経系や表皮系の細胞は外胚葉から作られることが明らかにされており、神経系の細胞へ分化が運命つけられた外胚葉を神経性外胚葉 (neural ectoderm)、表皮系の細胞へ分化が運命つけられた外胚葉は非神経性外胚葉 (non-neural ectoderm) と呼ばれている。

【0006】

以上述べた胚発生過程における細胞系譜の中で、受精卵からはじまり桑実胚までの個々の割球細胞、胚盤胞における内部細胞塊の細胞、および原始外胚葉層を構成している細胞は全能性を持ち未分化な胚性幹細胞としての性質を有している。原始外胚葉が各胚葉に分化をはじめるとそのほとんどの細胞は全能性を失うが、その一部が次の世代へ遺伝子を伝達する役目を担う始原生殖細胞 (primordial germ cell) として残される。始原生殖細胞は、原始外胚葉が各胚葉に分化するときに原条から陥入する胚性中胚葉細胞層の中にまぎれて後方に移動し、尿膜 (allantois) 基部の胚体外中胚葉 (extraembryonic mesoderm) の中の特定の部位に出現する。始原生殖細胞は、やがて、生殖巣原基へ向かって移動し生殖巣の性分化にしたがって卵子や精子を形成する。

【0007】

胚性幹細胞は、胚盤胞の内部に存在する未分化幹細胞である内部細胞塊を構成している細胞を培養に移し、頻繁に細胞塊の解離と継代を繰り返すことで樹立できる。この細胞は正常核型を維持しながらほぼ無限に増殖と継代を繰り返すことが可能であり、内部細胞塊と同じようにあらゆる種類の細胞に分化することができる多分化能を保つことが知られている。

【0008】

胚性幹細胞を他個体の胚盤胞の中に注入すると、宿主胚の内部細胞塊の細胞と混ざり合って胚と胎児の形成に寄与しキメラ個体をつくる。極端な場合には、胎児本体がほぼ注入した胚性幹細胞だけからなる個体が生まれることもある。キメラ個体の中で、注入した胚性幹細胞が将来卵や精子をつくる始原生殖細胞の形成に寄与した個体を生殖系列キメラと呼び、この生殖系列キメラを交配させることによって注入した胚性幹細胞由来の個体を得ることができることから、胚性幹細胞はあらゆる細胞に分化することができる全能性を有していることが証明されている (Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994); Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993); バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995))。

【0009】

胚盤胞の内部細胞塊を通常の初代培養のように培養すると、ほとんどの場合、直に繊維芽細胞様の細胞に分化してしまう。未分化な状態を維持しながら培養するためには、通常、胎児から調整した初代繊維芽細胞やS I H Mマウス由来のS T O細胞などをフィーダー細胞として用いる必要がある (Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993); バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995))。フィーダー細胞上で適切な細胞密度を保ち、頻繁に培養液を交換しながら細胞の解離と継代を繰り返すことで未分化幹細胞の性質を保持したまま維持することが可能となる (Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994))。

【0010】

胚性幹細胞の未分化状態を維持する因子としてL I F (leukaemia inhibitory factor) が同定されており (A. G. Smith and M. L. Hooper; Dev. Biol., 121, 1, 1987; A. G. Smithら; Nature, 336, 688, 1988; P. D. Rathjenら; Genes Dev., 4, 2308, 1990)、培養液中にL I Fを添加することによって、フィーダ

ー細胞を用いなくても全能性をもつ胚性幹細胞を単離し培養することが可能なことが報告されている (J. Nicholsら; *Development*, 110, 1341, 1990; S. Peaseら; *Dev. Biol.*, 141, 344, 1990)。また、L I F そのものを培養液に添加する代わりに、L I F の受容体のサブユニットの一つである g p 1 3 0 を受容体として共有しているインターロイキン 6 のファミリー分子の添加も有効であることが示されている (D. P. Gearing and G. Bruce; *New Biol.*, 4, 61, 1992; J. I. Conoverら; *Development*, 119, 559, 1993; C. Piquet-Pellorceら; *Exp. Cell Res.*, 213, 340, 1994; D. Pennicaら; *J. Biol. Chem.*, 270, 10915, 1995)。

【 0 0 1 1 】

さらに、g p 1 3 0 を直接活性化する作用を有するインターロイキン 6 と可溶性インターロイキン 6 受容体とを併用することで、胚性幹細胞の未分化状態を維持し生殖系列の細胞の形成に寄与する胚性幹細胞を樹立した報告がなされおり (K. Yoshidaら; *Mech. Dev.*, 45, 163, 1994; J. Nicholsら; *Exp. Cell Res.*, 215, 237, 1994; 特開平7-51060号)、g p 1 3 0 からの細胞内情報伝達が胚性幹細胞の多分化能や未分化性の維持に重要な働きをしていることが明らかにされている。このことは、L I F 遺伝子や L I F 受容体遺伝子を遺伝子ターゲッティングの手法を用いて破壊した欠損マウスにおいても初期胚の正常な発生が観察されるが (C. L. Stewartら; *Nature*, 359, 76, 1992; J. L. Escaryら; *Nature*, 363, 361, 1993; M. Liら; *Nature*, 378, 724, 1995; C. B. Wareら; *Development*, 121, 1283, 1995)、g p 1 3 0 遺伝子を破壊したマウスにおいては、胎生 1 2.5 日から出産に至る過程で胎生死することからも支持されている (K. Yoshidaら; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 407, 1996)。

【 0 0 1 2 】

1981年、マウスにおいて胚性幹細胞が初めて樹立されて以来 (M. J. Evansら; *Nature*, 292, 154, 1981; G. R. Martin; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7634, 1981)、効率的な胚性幹細胞の樹立方法、例えば非マウスにおける胚性幹細胞の樹立法 (米国特許 5,453,357号; 米国特許 5,670,372号) などが研究され、これまでに、ラット (P. M. Iannacconeら; *Dev. Biol.*, 163, 288, 1994)、ニワトリ (B. Painら; *Development*, 122, 2339, 1996; 米国特許 5,340,740号;

米国特許 5,656,479号)、ブタ (M. B. Wheeler; *Reprod. Fertil. Dev.*, 6, 563, 1994; H. Shimら; *Biol. Reprod.*, 57, 1089, 1997)、サル (J. A. Thomsonら; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7844, 1996)、ヒト (J. A. Thomsonら; *Science*, 282, 1145, 1998; M. J. Shamblottら; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 13726, 1998) の胚性幹細胞が樹立されている。

【0013】

胚性幹細胞を、胚性幹細胞と同系統の動物の皮下などに移植すると、様々な組織が混ざり合った奇形腫が形成されることが知られている (*Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)*)。

また、インビトロの培養においても、胚性幹細胞を凝集させ、いったん擬似胚状態にしたエンブリオイドボディと呼ばれる細胞塊 (embryoid body; 以下、EBとも略す) を形成させることによって分化を誘導し、内胚葉細胞、外胚葉細胞、中胚葉細胞、血液細胞、内皮細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、グリア細胞、神経細胞、上皮細胞、メラノサイト、ケラチノサイトの各種細胞を出現させることが可能であることが報告されている (P. D. Rathjenら; *Reprod. Fertil. Dev.*, 10, 31, 1998)。しかしながら、この培養方法による分化の誘導では、細胞凝集塊の形成による自発的な分化が引き起こされ、結果として目的とした細胞の出現が観察されているのであって、ある特定の細胞集団を効率的に誘導するまでには至っておらず、同時に多種類の組織細胞の出現も観察されている。

【0014】

胚性幹細胞から神経系細胞を効率的に分化誘導させる方法に関しては、様々な試みがなされている。

EBを形成させた後、ポリ-L-リジンあるいはラミニンをコートした硝子デッシュ上でNGFを添加した培地を用いて培養を続けると、神経系細胞の分化に重要な転写因子Pax3およびニューロフィラメントの発現が有為に上昇することが報告されている (G. Yamadaら; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199, 552, 1994)。後述するEC細胞において、レチノイン酸処理により神経系への分化

が促進されるという知見 (E. M. V. Jones-Villeneuveら; J. Cell Biol., 94, 253, 1982; G. Bainら; BioEssays, 16, 323, 1994) からその効果が胚性幹細胞においても試され、レチノイン酸存在下で4日間EBを培養した後、トリプシン処理し単層培養を行なうと、突起を進展させ活動電位を発生する神経細胞様の細胞が約40%という高率で出現し、この細胞では蛋白レベルでクラスIIIチューブリン、ニューロフィラメントMサブユニット、神経特異的なカルモジュリン結合キナーゼCの基質であるGAP-43 (growth-associated protein-43)、MAP-2 (microtubule-associated protein-2)、 γ アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid; 以下、GABAとも略す) 受容体、NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体、シナプシンの発現が、mRNAレベルでニューロフィラメントLサブユニット、グルタミン酸受容体、チロシン水酸化酵素、転写因子Brn-3、GFAP (glial fibrillary acidic protein)、GABA合成酵素であるGAD (glutamic acid decarboxylase) の発現が観察されることが報告されている (G. Bainら; Dev. Biol., 168, 342, 1995; F. A. Michaelら; J. Neurosci., 16, 1056, 1996)。

【0015】

Brn-3は中枢神経で (X. Heら; Nature, 340, 35, 1989)、GAP-43は神経軸索で (L. I. Benowitz and A. Routtenberg; Trends Neurosci., 20, 84, 1997)、MAP-2は神経樹状突起で (L. I. Binderら; Ann. NY Acad. Sci., 76, 145, 1986)、GFAPはグリア細胞で (A. Bignamiら; Brain Res., 43, 429, 1972)、GABA受容体およびGADは抑制性神経で (Y. Chang and D. I. Gottlieb; J. Neurosci., 8, 2123, 1988)、グルタミン酸受容体およびNMDA受容体は興奮性神経で発現することが知られているため、レチノイン酸を用いて分化を誘導した場合には、様々な神経系細胞への分化のシグナルが同時に伝わることを示されている。

【0016】

また、EB形成による細胞間相互作用を介さないで、胚性幹細胞に直接レチノイン酸を作用させただけでは、神経系細胞への分化誘導は観察されないことが報告されている (H. G. Slagerら; Dev. Gen., 14, 212, 1993)。単層培養した胚

性幹細胞に 10^{-7} mol/l 濃度のレチノイン酸を作用させると、3日後約50%の細胞でGAP-43の発現が、4～5日後5%未満の細胞でニューロフィラメント-165 (S. H. Yen and K. L. Fields; J. Cell Biol., 88, 115, 1981) の発現が蛋白レベルで観察されているが、GAP-43陽性細胞のほとんどは内胚葉系細胞様の形態であることが報告されている (W. G. van Inzenら; Biochim. Biophys. Acta., 1312, 21, 1996)。GAP-43陽性細胞の中には一部グリア細胞様の形態を示し、そのうち約半分がニューロフィラメント-165陽性の細胞であるが、EBを形成後のレチノイン酸処理で誘導される神経細胞様の細胞と比較してGAP-43及びニューロフィラメント-165ともに抗体染色による染色強度が低いことが報告されている (W. G. van Inzenら; Biochim. Biophys. Acta., 1312, 21, 1996)。このように、EB形成による細胞間相互作用は効率的な神経系細胞の分化誘導に必要であることが確かめられている。

【0017】

さらに、グリア細胞様の形態をとる細胞を対象としてパッチクランプの手法を用い活動電位を測定したところ、5-HT (5-hydroxytryptamin)、GABA、カイニン酸、グルタミン酸、ドーパミン、カルバコール刺激による電位の発生が調べた約半数の細胞で観察されるが、対照として用いたEB形成後のレチノイン酸処理で誘導される神経細胞様の細胞では、カルバコール刺激による活動電位の発生が観察されず、代わりにノルアドレナリン刺激による活動電位の発生が観察されており、神経細胞の分化の方向性の決定にもEB形成による細胞間相互作用が重要であることが示されている (W. G. van Inzenら; Biochim. Biophys. Acta., 1312, 21, 1996)。細胞凝集によるEB形成では、EB表面の細胞層が原始内胚葉様に分化することが知られており、この細胞層と内部の未分化細胞との何らかの相互作用により分化が誘導されていることが想定されているが、その因子の具体的な同定には至っていない (P. D. Rathjenら; Reprod. Fertil. Dev., 10, 31, 1998)。

【0018】

その後、さらに、胚性幹細胞に対するレチノイン酸の効果が詳細に解析された結果、レチノイン酸が添加された培地で形成されたEBを組織培養用のデッシュ

で培養すると、まず、ネスチン陽性で神経細胞およびグリア細胞の共通の前駆細胞である細胞が出現し、次に、GABA作動性神経細胞、コリン作動性神経細胞、GFAP陽性のアストロサイト、O4陽性(M. Schachnerら; Dev. Biol., 83, 328, 1981)のオリゴデンドロサイト様に分化した細胞が出現することが明らかにされている(A. Fraichardら; J. Cell Sci., 108, 3181, 1995)。

【0019】

生体において、神経細胞とグリア細胞がネスチン陽性の共通の前駆細胞から分化することはレトロウイルスを用いたラベリング実験で示唆され(U. Lendahlら; Cell, 60, 585, 1990; J. Priceら; Development Supplement, 2, 23, 1991; J. Priceら; Brain Pathol., 2, 23, 1992)、その後、成体の脳に存在する前駆細胞が神経系幹細胞として単離されたことで証明されている(S. J. Morrisonら; Cell, 88, 287, 1997; R. D. G. McKay, Science, 276, 66, 1997)。

しかしながら、レチノイン酸を胚性幹細胞の分化誘導に用いる際には、生理的に存在している濃度より非常に高い濃度(10倍～100倍)で用いられる。生理的に存在している濃度より高いレチノイン酸を用いることは、毒性の面から懸念されているため、得られた細胞を移植に用いるのは難しい。そこでレチノイン酸を用いずに、より生理的条件に近い状態で胚性幹細胞を神経系の細胞に分化誘導する試みもなされている。

4日間浮遊培養することによって形成させたEBを組織培養用のデッシュ上で1日培養し接着させ、インスリン、トランスフェリン、塩化セレン、フィブロネクチンを含むITSFn培地(A. Rizzino and C. Growley; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 457, 1980)を用いて5～7日間培養することで、ネスチン陽性でかつ脳で発現が観察される脂肪酸結合蛋白陽性(A. Kurtzら; Development, 120, 2637, 1994)の神経上皮細胞様の前駆細胞(neuroepithelial precursor cells)が誘導され、その前駆細胞をbFGF(basic fibroblast growth factor)とラミニンを含むmN3無血清培地で培養すると前駆細胞として増殖維持されるが、bFGFを除いた培地では中枢系の神経細胞およびグリア細胞に分化し、さらに血清を添加した培地を用いて培養を続けると興奮性神経系および抑制性神経系のシナプス形成が観察されることが報告されている(S. Okabeら; Mech. De

v., 59, 89, 1996)。

【0020】

このようにしてインビトロで誘導された神経系細胞が、生体内において正常に機能しうるかについても検討されている。

上述のITSFn培地を用いて誘導したマウスの神経上皮細胞様の前駆細胞を胎生16日～18日のラットの脳室に移植すると、移植した前駆細胞が移動し脳組織に取り込まれ、神経、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化し形態的には宿主の細胞と区別がつかないことが観察されている (O. Brustleら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 14809, 1997)。しかしながら、移植部位には、盛んに分裂を繰り返す神経管様の構造体やアルカリフォスファターゼ陽性の未分化細胞からなる小さなクラスターの形成など、本来の組織には観察されない奇形腫瘍組織の形成が観察されている。

【0021】

このような奇形腫瘍組織の形成は、胚性幹細胞からレチノイン酸を用いて誘導した神経系の前駆細胞の移植においても観察されている (J. Dinsmoreら; Cell Transplant., 5, 131, 1996; T. Deaconら; Exp. Neurol., 149, 28, 1998)。

その後、胚性幹細胞からグリア細胞の前駆細胞を誘導し、その前駆細胞を先天性にミエリン髄鞘を欠損しているラットの脳や脊髄に移植することで、奇形腫の形成なしにミエリン髄鞘の修復が観察されることが報告されている (O. Brustleら; Science, 285, 754, 1999)。この移植では、上述のEB形成後、ITSFn培地を用いて誘導した神経上皮細胞様の前駆細胞から、さらに分化が進んだグリア細胞の前駆細胞を誘導し移植に用いている。

【0022】

すなわち、誘導した神経上皮細胞様の前駆細胞をポリオルニチンでコートしたデッシュ上でインスリン、トランスフェリン、プロジェステロン、ブトレシン、塩化セレン、FGF2 (fibroblast growth factor 2)、ラミニンを含む培地で5日間培養し、カルシウムおよびマグネシウムを含有していないハンクスの緩衝液を用いて細胞を剥がし、5分の1の細胞密度でFGF2とEGF (epidermal growth factor) を含む培地で継代培養し、ほぼコンフルエント状態に達したら

もう一度5分の1の細胞密度でFGF2とPDGF-AA (platelet-derived growth factor-AA) を含む培地に継代し培養を続けることでグリア細胞の前駆細胞へと分化を誘導することが可能であり、移植に用いることが可能であることが示されている。このようにして分化誘導した細胞は、A2B5陽性であること (M. C. Raffら; *Nature*, 303, 390, 1983)、FGF2およびEGFを含まない培地で培養するとアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトへの分化がインビトロで観察されることからグリア細胞の前駆細胞であることが明らかにされている。

【0023】

上記胚性幹細胞と同様の機能を有する細胞について、胚性幹細胞との関係を以下に説明する。

悪性奇形腫 (teratocarcinoma) より胚性幹細胞と同様多分化能を有する細胞株として、種々の胚性癌腫細胞 (embryonal carcinoma cell; EC細胞) が樹立されている (M. J. Evans; *J. Embryol. Exp. Morph.*, 28, 163, 1972)。

これらの細胞は、胚性幹細胞のマーカーとなる遺伝子を発現していること (E. G. Bernstineら; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 3899, 1973; S. B. Diwan and L. C. Steven; *J. Natl. Cancer Inst.*, 57, 937, 1976; D. Solter and B. B. Knowles; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 5565, 1978; B. A. Hoslerら; *Mol. Cell. Biol.*, 9, 5623, 1989; S. C. Pruitt; *Development*, 120, 37, 1994)、インビトロにおいて様々な細胞に分化する能力を有していること (G. R. Martin and M. J. Evans; *Cell*, 6, 467, 1975; G. R. Martin and M. J. Evans; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1441, 1975; M. W. McBurney; *J. Cell. Physiol.*, 89, 441, 1976)、同系個体への移植において様々な組織からなる奇形種が形成されること (L. J. Kleinsmith and G. B. Pierce; *Cancer Res.*, 24, 797, 1964)、胚盤胞の中に注入すると胎児形成に寄与しキメラ個体を形成すること (B. Mintz and K. Illmensee; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 3538, 1975; V. E. Papaioannouら; *Nature*, 258, 70, 1975; M. J. Deweyら; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5564, 1977)、極めて稀ではあるが胚性癌腫細胞株の中には生殖系列キメラを作製する能力を持つ例も報告されていること (T. A.

Stewart and B. Mintz; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7634, 1981) から、胚性幹細胞が有する未分化幹細胞としての性質を有した細胞と考えられている。

【 0 0 2 4 】

また、始原生殖細胞を培養する際に b F G F を加えると胚性幹細胞に類似した細胞の細胞株が出現することが示され、E G 細胞 (embryonic germ cell) として樹立された (Y. Matsuiら; Cell, 70, 841, 1992; J. L. Resnicら; Nature, 359, 550, 1992)。この E G 細胞は、生殖系列キメラの形成に寄与できる能力を有しており (C. L. Stewartら; Devel. Biol., 161, 626, 1994; P. A. Laboskyら; Development, 120, 3197, 1994)、上記胚性幹細胞が有する未分化幹細胞としての性質を有していることが明らかにされている。未分化幹細胞と生殖細胞にはかなり共通した性質があり、増殖や分化の制御状態変化によって比較的容易に相互変換できると考えられている。

【 0 0 2 5 】

一方、発生工学の進歩により、個々人の胚性幹細胞を作成する可能性について報告されている。1997年、Wilmutらによって哺乳動物ではじめて、体細胞の核由来のクローン個体である羊ドリーが作出されて以来 (I. Wilmutら; Nature, 385, 810, 1997)、胎児細胞の核を用いたクローンウシ (J. B. Cibelliら; Science, 280, 1256, 1998)、皮膚、筋肉、耳殻、卵管、卵丘細胞の核を用いたクローンウシ (入谷明; 蛋白核酸酵素, 44, 892, 1999)、クローンヤギ (A. Baguisiら; Nature Biotechnology, 17, 456, 1999)、卵丘細胞の核を用いたクローンマウス (T. Wakayamaら; Nature, 394, 369, 1998)、雄の尾の細胞を用いたクローンマウス (T. Wakayamaら; Nature Genetics, 22, 127, 1999)、胚性幹細胞の核を用いたクローンマウス (T. Wakayamaら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 14984, 1999; W. M. Rideout IIIら; Nature Genetics, 24, 109, 2000) の作出が報告されており、体細胞の核を、脱核した受精卵に導入することで哺乳動物のクローン個体を作成することが可能であることが示されている。この核移植の技術と胚性幹細胞を樹立する技術を組み合わせることで個々人の胚性幹細胞の作成が可能であり、細胞医療としての臓器移植への応用の可能性が指摘されている (R. P. Lanzaら; Nature Medicine, 5, 975, 1999)。また、胚性幹細胞に

遺伝子操作を加えることでより効果的な遺伝子治療を行うことが可能であることや、組織適合性抗原の改変が可能なことも指摘されている (P. D. Rathjenら; Reprod. Fertil. Dev., 10, 31, 1998)。

【0026】

臓器移植における細胞医療の有効性について例をあげて説明する。

パーキンソン病は、黒質線条体ドーパミン神経細胞の変性を主体とする慢性進行性疾患である。従来より、L-DOPAを中心とする内服療法が行われてきたが、長期にわたる内服が必要なため、多くの患者においてその効果が次第に減弱し、wearing off現象、ジスキネジアなどの副作用になやまされるようになる。このため、より有効な治療法の開発が模索され、パーキンソン病患者に対して中絶胎児脳を移植する治療が行われ始めた。全世界では、これまでに、数百例の中絶胎児脳を移植する治療が施行されている。最近、米国では、40人のパーキンソン病患者を対象に、中絶胎児脳細胞の移植手術の二重盲検試験が行われ、その有用性が証明された。さらに、このような中絶胎児脳細胞移植を受けた患者の中には、10年以上にもわたって移植した細胞が定着し移植した細胞が線条体とシナプスを形成している例が報告されている。このように、中絶胎児の脳を移植する細胞治療がパーキンソン病に対して高い有効性を示すことが分かってきているが、中絶胎児を利用することに倫理的な問題を指摘する声が強い。また、実際には、一人の患者を治療するのに10体近い胎児が必要であるために、現実的な医療への応用に大きな障害となっている。したがって、ドーパミン作動性神経細胞を、社会通念上許容される方法で、かつ多量に調製する方法の開発が望まれている。

【0027】

【発明が解決しようとする課題】

以上のような背景から、多分化能を保持したまま培養可能な未分化幹細胞から目的とする機能性細胞を選択的に、かつ効率的に分化誘導するための方法の開発が注目され、様々な試みがなされている。しかしながら、奇形腫瘍の形成をともなわない細胞集団を効率的に分化誘導する方法の開発は、未だ多くの機能細胞において成功していない。また、細胞医療の観点から、目的とする機能細胞を人為的にコントロールされた生理的環境下、例えば、血清やレチノイン酸を用いない

培養条件で誘導することが望まれているが、そのような方法も知られていない。特に、外胚葉由来の細胞、具体的には正常な機能を有するドーパミン作動性神経細胞を、未分化幹細胞から効率的に分化誘導し取得する方法は、パーキンソン病をはじめとする脳疾患患者への医療の観点から重要であり切望されているが、未だ開発されていない。

【0028】

本発明は、細胞及び臓器移植医療に利用可能であり、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を選択的且つ効率的に分化誘導する方法、該分化誘導した細胞、並びにこれらの用途を提供することを目的とする。本発明はまた、該分化誘導する方法に用いる培地、該分化誘導する方法に用いるストローマ細胞を特異的に認識する抗体の取得方法、それにより取得される抗体、該抗体が認識する抗原の取得方法、それにより取得される抗原、並びにこれらの用途を提供することを目的とする。

【0029】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、胚性幹細胞の分化を引き起こす様々な培養条件を鋭意検討した結果、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する、選択的且つ効率的な方法を見出すことに成功し、本発明を完成するに至った。

【0030】

即ち、本発明は、以下の(1)～(47)に関する。

(1) 胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程を含む、胚性幹細胞を外胚葉細胞に分化誘導する方法。

【0031】

本発明において、胚性幹細胞とは、インビトロにおいて培養することが可能で、かつ、生体を構成するすべての細胞に分化しうる多分化能を有する細胞を包含する。その例としては、(a)：着床以前の初期胚を培養することによって樹立した哺乳動物等の胚性幹細胞が挙げられ、具体的には、初期胚を構成する内部細胞塊より樹立されたES細胞、始原生殖細胞から樹立されたEG細胞、着床以前の初期胚の多分化能を有する細胞集団（例えば、原始外胚葉）から単離した細胞

、あるいはその細胞を培養することによって得られる細胞が挙げられる。悪性奇形腫より樹立されたEC細胞もES細胞と同様の性質を示すことが知られていることから、着床以前の初期胚を培養することによって樹立した哺乳動物等の胚性幹細胞に広義に含まれる。また、本発明における胚性幹細胞としては、上記（a）の胚性幹細胞、（b）：体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を培養することによって樹立した胚性肝細胞、または（c）：（a）あるいは（b）の胚性幹細胞の染色体上の遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて改変した胚性幹細胞を包含する。

【0032】

本発明において、外胚葉細胞とは、神経系細胞や表皮系細胞に分化しうる能力を有した細胞から構成される胚葉細胞を包含する。その例としては、原始外胚葉から分化した胎児の外胚葉細胞が挙げられる。

（2） 外胚葉細胞が、神経系細胞または表皮系細胞に分化しうる能力を有している細胞である、上記（1）に記載の方法。

（3） 胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程を含む、胚性幹細胞を外胚葉由来の細胞に分化誘導する方法。

本発明において、外胚葉由来の細胞とは、外胚葉細胞から分化した細胞で、かつ生体を構成する機能細胞を包含する。その具体例としては、神経系細胞や表皮系細胞が挙げられる。

（4） 外胚葉由来の細胞が、神経系細胞または表皮系細胞である、上記（3）に記載の方法。

神経系細胞としては、神経幹細胞、神経細胞などが挙げられる。表皮系細胞としては、表皮細胞などが挙げられる。

（5） 表皮系細胞が表皮細胞である、上記（4）に記載の方法。

【0033】

本発明の方法は、外胚葉細胞を表皮系細胞へ誘導する方法として用いることができる。

皮膚は、外胚葉に由来する上皮組織の表皮（epidermis）と、中胚葉に由来する結合組織の真皮（dermis）から構成されており、表皮細胞とは、表皮を構成する

上皮細胞として定義される。表皮は、基本的には角化した重層扁平上皮からなり、真皮から外表に向かって基底層 (stratum basale)、有棘層 (stratum spinosum)、顆粒層 (stratum granulosum)、淡明層 (stratum lucidum)、角質層 (stratum corneum) からなる。表皮細胞は、形態とケラチンフィラメントの発現様式を指標として分類される。ケラチン 8 と 1 8 は発生の段階の初期に発現し胎児初期における上皮細胞のマーカーとして用いられる (R. G. Oshimaら; Dev. Bio., 99, 447, 1983)。ケラチン 1 9 は胎児における上皮細胞のマーカーとして用いられる (P. C. Stasiak & E. B. Lane; Nucleic Acids Res., 15, 10058, 1987)。ケラチン 5 と 1 4 は表皮の基底層を構成する上皮細胞のマーカーとして用いられる (E. Fuchs & H. Green; Cell, 19, 1033, 1980)。角化中の表皮細胞はケラチノサイトと呼ばれ、角化に伴いケラチン 5 や 1 4 の発現が減少し代わりにケラチン 1 や 1 0 の発現が上昇する (E. Fuchs & H. Green; Cell, 19, 1033, 1980; C. Baguttiら; Dev. Biol., 179, 184, 1996)。

表皮系細胞、特に表皮細胞の識別は、上記各ケラチンに対する抗体や非神経外胚葉細胞のマーカーである E カドヘリンに対する抗体で検出したり、これらのタンパク質の mRNA を検出することで行うことができる。

本発明の方法は、好適に高い細胞分裂能を有する基底層部の表皮細胞へ分化誘導することができる。

(6) 骨形成因子 4 (Bone Morphogenetic Protein 4) 存在下で培養することを特徴とする、上記 (1) ~ (5) のいずれか 1 項に記載の方法。

(7) 神経系細胞が神経幹細胞または神経細胞である、上記 (4) に記載の方法。

【 0 0 3 4 】

神経細胞とは、他の神経細胞あるいは刺激受容細胞からの刺激を受け別の神経細胞、筋あるいは腺細胞に刺激を伝える機能を有する細胞を意味する。

神経細胞は、産生する神経伝達物質の違いにより分類されており、具体的には、神経伝達物質の合成酵素や神経伝達物質そのものを用いて識別されている。非ペプチド性の神経伝達物質としては、ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン、セロトニン、アセチルコリン、 γ アミノ酪酸、グルタミン酸が存在する。

ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリンの3種類は総称してカテコールアミンと呼ばれる。

これらの神経伝達物質で分類される神経細胞としては、例えば、ドーパミン作動性神経細胞、アセチルコリン作動性神経細胞、 γ アミノ酪酸作動性神経系細胞、セロトニン作動性神経細胞、ノルアドレナリン作動性神経細胞、アドレナリン作動性神経細胞、グルタミン酸作動性神経細胞などが挙げられる。

【0035】

カテコールアミン作動性神経細胞は共通してチロシン水酸化酵素を発現し、ノルアドレナリン作動性神経細胞とアドレナリン作動性神経細胞では共通してドーパミン- β -ヒドロキシラーゼを発現する。また、ノルアドレナリン作動性神経細胞ではフェニルエタノールアミン N-メチルトランスフェラーゼを発現し、セロトニン作動性神経細胞ではトリプトファン ヒドロキシラーゼを発現し、アセチルコリン作動性神経細胞ではコリンアセチルトランスフェラーゼを発現し、 γ アミノ酪酸作動性神経細胞ではグルタミン酸デカルボキシラーゼをそれぞれ特異的に発現している。これらの酵素をコードする mRNA の発現状況を調べることで各々の神経細胞を識別できる。しかしながら、グルタミン酸作動性神経細胞を特異的に識別する酵素は今のところ知られていない。

【0036】

一方、ペプチド性の神経伝達物質には以下のものがある；副腎皮質刺激ホルモン (Corticotropin (ACTH))、 $\alpha\alpha\gamma$ 、 β -リポトロピン (Lipotropin)、 α -メラニン細胞刺激ホルモン (MSH)、 α -エンドルフィン (Endorphin)、 β -エンドルフィン、 γ -エンドルフィン、メチオニンエンケファリン (Met-Enkephalin)、ロイシンエンケファリン (Leu-Enkephalin)、 α -ネオエンドルフィン (Neoendorphin)、 β -ネオエンドルフィン、ダイノルフィン A (Dynorphin A)、ダイノルフィン B (Dynorphin B)、ロイモルフィン (Leumorphin)、バソプレッシン (Vasopressin)、ニューロフィシン (Neurophysin)、オキシトシン (Oxytocin)、ニューロフィシン I (Neurophysin I)、サブスタンス P (Substance P)、ニューロキニン A (Neurokinin A)、神経ペプチド K (Neuropeptide K)、神経ペプチド γ (Neuropeptide- γ)、ニューロキニン B (Neurokinin B)

)、ボンベシン (Bombesin)、ガストリン放出ペプチド (Gastrin-releasing peptide)、セクレチン (Secretin)、モチリン (Motilin)、グルカゴン (Glucagon)、バソアクチブインテスティナルペプチド (Vasoactive intestinal peptide)、成長ホルモン放出因子 (Growth hormone-releasing factor)、インスリン (Insulin)、インスリン様増殖因子 (Insulin-like growth factors)、ソマトスタチン (Somatostatin)、ガストリン (Gastrin)、コレシストキニン (Cholecystokinin)、神経ペプチド Y (Neuropeptide Y)、膵臓ポリペプチド (Pancreatic polypeptide)、ペプチド YY (Peptide YY)、副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (Corticotropin-releasing factor)、カルシトニン (Calcitonin)、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (Calcitonin gene-related peptide)、アンギオテンシン (Angiotensin)、ブラジキニン (Bradykinin)、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (Thyrotropin-releasing hormone)、ニューロテンシン (Neurotensin)、ガラニン (Galanin)、黄体形成ホルモン放出ホルモン (Luteinizing hormone-releasing hormone)。これらのペプチド性神経伝達物質を産生する神経細胞は、神経伝達物質そのもの、神経伝達物質前駆ペプチド、該神経伝達物質前駆ペプチドをコードする mRNA の発現を検出することで識別することができる。

【0037】

本発明の分化誘導法は、ドーパミン作動性神経細胞、アセチルコリン作動性神経細胞、 γ アミノ酪酸作動性神経系細胞、セロトニン作動性神経細胞への分化誘導に好適に用いられる。

特に、本発明の方法により胚性幹細胞から誘導されたドーパミン作動性神経細胞とは、カテコールアミン作動性神経細胞に共通して発現が観察されるチロシン水酸化酵素を発現しているが、ノルアドレナリン作動性神経細胞とアドレナリン作動性神経細胞に共通して発現が観察されるドーパミン- β -ヒドロキシラーゼを発現しない細胞として特徴づけられ、移植により神経変性疾患、例えばパーキンソン病の症状を改善する能力を有している細胞である。

【0038】

神経幹細胞とは、神経細胞 (neuron)、アストロサイト (astrocyte) および

オリゴデンドロサイト (oligodendrocyte) に分化しうる能力を有し、かつ自己複製能力を有する細胞として定義される。胚性幹細胞のようにすべての細胞に分化する多分化能は有していないが、脳内において神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを供給する機能を有しており、例えば、脳移植によりその分化能を検証することができる。また、インビトロにおいても、神経幹細胞から神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを分化誘導する方法が知られており、これら方法を用いてその分化能を確認できる。このような機能を有した神経幹細胞は、神経前駆細胞での発現が確認されている細胞骨格蛋白質ネスチンを認識する抗ネスチン抗体で染色可能である (R. McKay; Science, 276, 66, 1997)。

本発明の方法は、好適にネスチン陽性の神経幹細胞へ効率的に分化誘導することができる。

(8) 神経細胞が、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれる神経細胞である、上記 (7) に記載の方法。

- (a) ドーパミン作動性神経細胞；
- (b) アセチルコリン作動性神経細胞；
- (c) γ アミノ酪酸作動性神経細胞；
- (d) セロトニン作動性神経細胞。

(9) 非凝集状態が、エンブリオイドボディを介さない状態である、上記 (1) ~ (8) のいずれか 1 項に記載の方法。

(10) 無血清培養の条件下で培養する工程を含むことを特徴とする、上記 (1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載の方法。

【0039】

(11) ストローマ細胞由来の因子の存在下で培養することを特徴とする、上記 (1) ~ (10) のいずれかに記載の方法。

(12) ストローマ細胞存在下で培養することを特徴とする、上記 (1) ~ (11) に記載の方法。

(13) ストローマ細胞が、物理化学的処理により増殖能力を失ったストローマ細胞である、上記 (12) に記載の方法。

(14) 物理化学的处理が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる処理である、上記 (13) に記載の方法。

(a) 抗癌剤による処理；

(b) 放射線の照射による処理；

(c) 病理診断で用いられる組織固定のための処理。

(15) 抗癌剤が、マイトマイシンC、5-フルオロウラシル、アドリアマイシン及びメトトレキセートからなる群から選ばれる抗癌剤である、上記 (14) に記載の方法。

(16) 病理診断で用いられる組織固定のための処理が、マイクロウェーブ固定、急速凍結置換固定、グルタルアルデヒド固定、パラフォルムアルデヒド固定、ホルマリン固定、アセトン固定、ブアン固定、過ヨウ素酸固定、メタノール固定及びオスミウム酸固定からなる群から選ばれる処理である、上記 (14) に記載の方法。

【0040】

(17) ストローマ細胞が、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 及び (g) からなる群から選ばれるストローマ細胞である、上記 (11) ～ (16) のいずれか1項に記載の方法。

(a) 胎児初代培養繊維芽細胞；

(b) S I H M マウス由来 S T O 細胞；

(c) マウス胎児由来 N I H / 3 T 3 細胞；

(d) M - C S F 欠損マウス頭蓋冠由来 O P 9 細胞；

(e) マウス頭蓋冠由来 M C 3 T 3 - G 2 / P A 6 細胞；

(f) 胚性幹細胞由来のストローマ細胞；

(g) 骨髓間葉系幹細胞由来のストローマ細胞。

【0041】

(18) 胚性幹細胞が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる細胞である、上記 (1) ～ (17) のいずれか1項に記載の方法。

(a) 着床以前の初期胚を培養することによって樹立した胚性幹細胞；

(b) 体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を培養するこ

とによって樹立した胚性幹細胞；

(c) (a) 又は (b) の胚性幹細胞の染色体上の遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて改変した胚性幹細胞。

(19) 培養工程にレチノイン酸を添加しないことを特徴とする、上記(1)～(18)のいずれか1項に記載の方法。

(20) 胚性幹細胞を外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞に分化誘導する効率が5%以上である、上記(1)～(19)のいずれか1項に記載の方法。

(21) 実質的に中胚葉系細胞の分化誘導を伴わない、上記(1)～(20)のいずれか1項に記載の方法。

【0042】

(22) 上記(1)～(21)のいずれか1項に記載の方法で用いる、胚性幹細胞を外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導するための培地。

(23) 骨形成因子4 (Bone Morphogenetic Protein 4) を有効成分として含有する、外胚葉細胞の表皮系細胞への分化誘導剤。

(24) 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有するストローマ細胞または該細胞由来の因子を有効成分として含む、胚性幹細胞の外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞への分化誘導剤。

(25) ストローマ細胞が、上記(13)～(17)のいずれか1項に記載のストローマ細胞である、上記(24)記載の分化誘導剤。

(26) ストローマ細胞由来の因子がムコ多糖吸着能を有する、上記(24)又は(25)記載の分化誘導剤。

(27) ムコ多糖がヘパリンである、上記(26)記載の分化誘導剤。

【0043】

(28) 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有するストローマ細胞を、ムコ多糖を含む培地中で培養して得られる培養上清。

(29) ストローマ細胞が、上記(13)～(17)のいずれか1項に記載のストローマ細胞である、上記(28)に記載の培養上清。

(30) ムコ多糖がヘパリンである、上記(28)又は(29)記載の培養上

清。

(31) 上記(28)～(30)のいずれか1項に記載の培養上清を有効成分として含む、外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞の分化誘導剤。

【0044】

(32) ストローマ細胞を免疫原として用いることを特徴とする、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有するストローマ細胞を特異的に認識する抗体を取得する方法。

(33) ストローマ細胞が、上記(13)～(17)のいずれか1項に記載のストローマ細胞である、上記(32)記載の方法。

(34) 上記(32)または(33)に記載の方法により取得される、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞を特異的に認識する抗体。

(35) 上記(34)に記載の抗体を用いることを特徴とする、該抗体が認識する抗原を取得する方法。

(36) 上記(35)に記載の方法により取得される、上記(34)に記載の抗体が認識する抗原。

(37) 上記(36)に記載の抗原を含む細胞培養のための培地。

【0045】

(38) 上記(1)～(21)のいずれか1項に記載の方法を用いることによって誘導される、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞。

(39) 上記(38)に記載の外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を、抗癌剤を含む培地中で培養する工程を含むことを特徴とする、胚性幹細胞から分化誘導された細胞の純度を高める方法。

(40) 抗癌剤が、マイトマイシンC、5-フルオロウラシル、アドリアマイシン、メトトレキセート及びアラCからなる群から選ばれる抗癌剤である、上記(39)に記載の方法。

(41) 上記(39)または(40)に記載の方法を用いて得られる、細胞。

(42) 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、上記(1)～(21)のいずれか1項に記載の方法を行い、該被験物質存在下と該被験物質非存在下で

の胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程を比較することを特徴とする、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程における調節に関連する物質の評価方法。

(43) 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、上記(1)～(21)のいずれか1項に記載の方法を行い、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程を比較することを特徴とする、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程における調節に関連する物質のスクリーニング方法。

(44) 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、前記(38)に記載の細胞を培養し、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能を比較することを特徴とする、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能の調節に関連する物質の評価方法。

(45) 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、前記(38)に記載の細胞を培養し、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能を比較することを特徴とする、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能の調節に関連する物質のスクリーニング方法。

【0046】

(46) 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞または該細胞由来の因子を含む医薬。

(47) ストローマ細胞が、前記(13)～(17)のいずれか1項に記載のストローマ細胞である、前記(46)記載の医薬。

(48) 前記(34)に記載の抗体を含む医薬。

(49) 前記(36)に記載の抗原を含む医薬。

(50) 前記(38)に記載の外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を含む医薬。

(51) 前記(41)に記載の細胞を含む医薬。

(52) 外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の診断、予防および／または治療のための医薬である、前記(46)～(51)のいずれか1項に記載の医薬。

(53) 外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患が、神経系細胞または表皮系細胞

胞の障害に基づく疾患である、前記（５２）に記載の医薬。

（５４） 神経系細胞の障害に基づく疾患が、アルツハイマー病、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、虚血性脳疾患、てんかん、脳外傷、背堆損傷、運動神経疾患、神経変性疾患、網膜色素変性症、内耳性難聴、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、または神経毒物の障害に起因する疾患であり、表皮系細胞の障害に基づく疾患が火傷、外傷、創傷治癒、床擦れ、または乾せんである、前記（５３）に記載の医薬。

【 0 0 4 7 】

（５５） 前記（３４）に記載の抗体を用いることを特徴とする、前記（３６）に記載の抗原の免疫学的検出法。

（５６） 前記（３４）に記載の抗体を用いることを特徴とする、前記（３６）に記載の抗原の免疫組織染色法。

（５７） 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を指標に、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞へ分化誘導する活性を有するストローマ細胞由来の因子を取得する方法。

（５８） ムコ多糖とストローマ細胞由来の因子を結合させる工程と、ムコ多糖に結合した該ストローマ細胞由来の因子から該因子を回収する工程を含む、前記（５７）に記載の方法。

（５９） ストローマ細胞が、前記（１３）～（１７）のいずれかに記載のストローマ細胞である、前記（５７）または（５８）記載の方法。

（６０） ムコ多糖が、ヘパリンである、前記（５８）に記載の方法。

【 0 0 4 8 】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施態様および実施方法について詳細に説明する。

本発明の分化誘導法は、上述のような胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程を含む、胚性幹細胞を外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞に分化誘導する方法である。

また、本発明の分化誘導法では、胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程において、レチノイン酸を用いずに培養することが好ましい。

【0049】

ここで、胚性幹細胞を非凝集状態で培養するとは、細胞同士の接着を解除した単一細胞状態 (single cell) (単一細胞状態とは、酵素消化等を施すことで細胞同士の接着がない個々の細胞がバラバラになった状態をいう) で培養を開始し、継続して培養することである。

この培養では、播種した細胞が凝集せず、エンブリオイドボディを形成しない。このような単一細胞状態で胚性幹細胞の培養を開始し、それを継続して培養するには、胚性幹細胞の培養において通常の胚性幹細胞の継代に用いられる細胞密度よりも低い細胞密度で播種し培養することで行うことができる。即ち、酵素消化等の処理を胚性幹細胞に施し、培地を用いて単一細胞状態の細胞懸濁液を調製し、その細胞懸濁液を、培養系にお互いの細胞が接触しない状態で存在できる程度に培養する。このような培養は、細胞を積極的に凝集させ擬似胚状態を再現することで分化誘導を引き起こそうとするエンブリオイドボディを用いた従来の培養方法とは根本的に考え方を異にするものである。ここで、培養系にお互いの細胞が接触しない状態で存在できる程度の播種用胚性幹細胞の細胞密度としては、好ましくは数十～数百細胞/cm²であり、より好ましくは30～300細胞/cm²である。

【0050】

また、レチノイン酸を用いずに培養するとは、非生理的な濃度のレチノイン酸を用いずに培養することである。非生理的な濃度とは、生体に生理的に存在する濃度の10倍以上の濃度を意味する。具体的には、通常ヒトの血中には約 10^{-8} mol/lの濃度のレチノイン酸が存在することが知られていることから (生化学辞典第2版, 東京化学同人, 1992)、 10^{-7} ～ 10^{-6} mol/lの濃度範囲が非生理的な濃度である。レチノイン酸は発生分化の際に形態形成に影響を及ぼす形態形成物質 (モルフォゲン) として作用を有しており、また細胞種によっては毒性なども強く、非生理的な濃度のレチノイン酸を用いた培養系を医療へ応用する際には二次的な副作用が懸念されている。従って、レチノイン酸を用いないで培養することは、上述のレチノイン酸使用にともなうリスクを回避することができるため有用である。

【0051】

本発明の分化誘導法において、培養系に中胚葉系細胞の分化が実質的に誘導されないことが好ましい。ここで、「中胚葉系細胞の分化が実質的に誘導されない」とは、培養系に分化してくる中胚葉系細胞の割合が、培養系全体の細胞数に対して5%以下であることを意味し、好ましくは2%以下である。

ここで、中胚葉系細胞とは、筋肉系、結合組織、骨格系、循環器系、泌尿器系、生殖系などの器官や組織を構成する細胞を意味する。

中胚葉系細胞を識別するには、中胚葉系細胞を特異的に認識する抗体で検出する方法、中胚葉系細胞で特異的に発現しているタンパク質のmRNAを検出する方法、そのタンパク質を特異的に認識する抗体を用いて検出する方法等を用いて行うことができる。

【0052】

本発明の、胚性幹細胞を上記非凝集状態で外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞に分化誘導する方法としては、好ましくはストローマ細胞あるいはストローマ細胞由来の因子の存在下で胚性幹細胞を培養する方法が挙げられる。

ストローマ細胞は、後述の1.に記載のとおりであり、ストローマ細胞由来の因子としては、後述の4に記載の抗原、後述の8の方法で得られる因子、ストローマ細胞の培養上清、ストローマ細胞の細胞断片等が挙げられる。

【0053】

本発明の分化誘導法としては、具体的には、

単一細胞状態の胚性幹細胞を調整する工程、該胚性幹細胞をストローマ細胞あるいはストローマ細胞由来の因子を存在させて、非凝集状態で培養する工程を含む方法が挙げられる。また、該工程においては、非生理的な濃度のレチノイン酸を用いずに培養することが好ましい。

本発明の、胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程は、無血清培養条件下で行われることが好ましいが、この工程の後に血清を添加した培養条件で培養する工程（例えば、後述の6に記載した基礎培地に、好ましくは数十%、より好ましくは5～20%の哺乳類血清を添加した培地を用い、37℃で数%、好ましくは5%の二酸化炭素を通気したCO₂インキュベーターにて培養する工程）を行うこ

ともできる。特に表皮系細胞に分化誘導させる場合には、この血清を添加した培養条件で培養する工程を含むことにより、分化誘導率をより高くすることができる。

本発明の分化誘導法において、ストローマ細胞と胚性幹細胞の培養系での比率は、胚性幹細胞を外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞に分化誘導することが可能である比率であればいかなる比率でもよいが、 $10^4 \sim 1$ 対1（ストローマ細胞数対胚性幹細胞数）、好ましくは $10^3 \sim 1$ 対1、より好ましくは $10^2 \sim 10$ 対1を挙げることができる。

外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞、具体的には神経系細胞に分化誘導するには、上述の工程を含む方法で適宜培地交換を行ないながら培養を継続することで行うことができる。

外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を表皮系細胞に分化誘導するには、BMP 4を上述の工程を含む培養系に添加することが好ましい。

【0054】

本発明の、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する具体的な培養法としては、用いる胚性幹細胞の分化誘導に適した培養法であればいずれも用いることができ、単層培養法、支持細胞との共培養法、高密度維持培養法、マイクロキャリア培養法、還流培養法、軟寒天培養法等を挙げることができる。具体的には、単一細胞状態とした胚性幹細胞を後述の7で調製した培地中で培養する方法、後述の6で調製した培地中にけん濁した単一細胞状態の胚性幹細胞を、あらかじめ後述の1で調製したストローマ細胞と非凝集状態で数日間共培養する方法などが挙げられる。ここで、胚性幹細胞とストローマ細胞との共培養としては、胚性幹細胞とストローマ細胞とが物理的に接触している場合や、両細胞が同じ培養系に存在するが物質の行き来が可能な隔壁により隔てられ細胞自体の物理的接触ができない場合も含まれる。

胚性幹細胞とストローマ細胞が同じ培養系に存在するが物質の行き来が可能な隔壁により隔てられ細胞自体の物理的接触ができない場合とは、例えば、通常の細胞培養に用いられるフィルターを用いて両細胞を隔てて培養する場合が挙げられる。フィルターの孔径としては、好ましくは $0.01 \sim$ 数十 μm 、より好まし

くは0.02～12 μ mのフィルターが好ましい。このようなフィルターとしては、具体的には、メンブレンカルチャーインサート（岩城硝子社製）、Nunc TCインサート（Nunc社製）、CO-CULTUREシャーレ（グライナー社製）、セルカルチャーインサート（ファルコン社製）、ケモタキシスチャンバー（Neuro Probe Inc.社製）等を挙げることができる。胚性幹細胞とストローマ細胞のどちらをフィルター上に培養しても構わないが、ストローマ細胞をフィルター上で培養する方が好ましい。

【0055】

本発明で利用できる培養器としては、胚性幹細胞を培養できるものであればいかなる培養器でも用いることができるが、好ましくは細胞培養用に用いられる培養器が望ましい。細胞培養用の培養器としては、例えば、フラスコ、組織培養用フラスコ、デッシュ、ペトリデッシュ、組織培養用デッシュ、コンツアーデッシュ、パーマノックスデッシュ、マルチデッシュ、マイクロプレート、マイクロウエルプレート、マルチプレート、マルチウエルプレート、セバプレートストリップウエル、テラサキプレート、組織培養用チャンバースライド、シャーレ、細胞培養用シャーレ、組織培養用チューブ、トレイ、細胞培養用トレイ、セルフアクトリ、培養バッグ、テクノポット、ローラーボトル、スピナー、フォロファイバー等が挙げられる。培養器と細胞との接着性を制御するために、培養器の細胞と接触する側の表面を人工的に処理を施すこともできる。培養器の表面を人工的に処理する例としては、コラーゲンコート、ゼラチンコート、ポリ-L-リジンコート、フィブロネクチンコート、ラミニンコート、プロテオグリカンコート、グリコプロテインコート、マトリゲルコート、シリコンコート等が挙げられる。また、プライマリア（Falcon社）などのように負の電荷を持つように処理することもできる。

本発明の胚性幹細胞の培養方法としては、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)、Methods in Enzymology volume 225, Guide to Techniques in Mouse Development, Academic Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲットティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995) 等に記載の

胚性幹細胞を培養するための方法が挙げられる。無血清培養することも可能で、例えば、Dulbecco MEM培地に15～20%のKNOCKOUTTM SR (GIBCOBRL社製)、2 mMグルタミン、100 μ M MEM Non-Essential Amino Acids溶液、50 U/ml ペニシリン、50 U/ml ストレプトマイシン、100 μ M 2-メルカプトエタノール、および1,000 U/ml LIFを加えた培地を用い、未分化な胚性幹細胞としての形質を保ったまま継代培養することができる (M. D. Goldsboroughら; Focus, 20, 8, 1998)。

【0056】

単一細胞状態とした胚性幹細胞を得る方法としては、組織細胞培養で用いられる既に公知の酵素消化の方法が挙げられる。その具体的例としては、前日培地交換を行い数十%～ほぼコンフルエント状態にまで増殖した胚性幹細胞を培養している培養皿から培地を除き、PBSを用いて数回、好ましくは2～3回洗浄し、適当な酵素消化液 (例えば、1 mM EDTA および0.25%トリプシンを含むPBS) を加え、37℃で数十分間、好ましくは5～20分間培養し、6で調製した培地にけん濁し、遠心操作 (例えば、4℃、200×gで5分間) を行ない、再び培地にけん濁することで単一細胞状態とした胚性幹細胞を回収することができる。

【0057】

胚性幹細胞とストローマ細胞とを共培養し、胚性幹細胞から外胚葉細胞および神経系細胞を分化誘導する方法としては、具体的には、回収した胚性幹細胞を6で調製した培地 (例えば、Glasgow MEM培地に10%のKNOCKOUTTM SR (GIBCOBRL社製)、2 mMグルタミン、50 U/ml ペニシリン、50 U/ml ストレプトマイシン、100 μ M MEM Non-Essential Amino Acids溶液、1 mMピルビン酸および100 μ M 2-メルカプトエタノールを添加した培地) にけん濁し、1で調製したストローマ細胞が培養されている培養器 (例えば、細胞培養用フラスコ) に、数十～数百細胞/cm²、好ましくは100細胞/cm²の細胞密度で播種し、5～20日間、好ましくは7～10日間37℃で数%、好ましくは5%の二酸化炭素を通気したCO₂インキュベーターにて培養する方法を挙げることができる。

【0058】

胚性幹細胞とストローマ細胞とを共培養し、胚性幹細胞から外胚葉細胞および表皮系細胞を分化誘導する方法としては、具体的には、回収した胚性幹細胞を6で調製した培地（例えば、Glasgow MEM培地に10%のKNOCKOUT™ SR（GIBCOBRL社製）、2 mMグルタミン、50 U/ml ペニシリン、50 U/ml ストレプトマイシン、100 μ M MEM Non-Essential Amino Acids溶液、1 mMピルビン酸、100 μ M 2-メルカプトエタノールおよび0.1~100 ng/ml、好ましくは1~50 ng/mlの濃度のBMP 4を添加した培地）にけん濁し、1で調整したストローマ細胞が培養されている培養器（例えば、細胞培養用フラスコ）に、数十~数百細胞/cm²、好ましくは100細胞/cm²の細胞密度で播種し、5~20日間、好ましくは7~10日間37℃で数%、好ましくは5%の二酸化炭素を通気したCO₂インキュベーターにて培養する方法を挙げることができる。

【0059】

また、胚性幹細胞とストローマ細胞とを共培養する代わりに、胚性幹細胞を培養する培地中にOP9細胞（T. Nakanoら；Science, 272, 722, 1996）、NIH/3T3細胞（J. L. Jainchillら；J. Virol., 4, 549, 1969）、またはMC3T3-G2/PA6細胞の培養上清を添加した培地を用いることで、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導することもできる。さらにまた、胚性幹細胞とストローマ細胞とを共培養する代わりに、培地中にOP9細胞、NIH/3T3細胞、MC3T3-G2/PA6細胞（H. Kodamaら；J. Cell. Physiol., 112, 89, 1982）、STO細胞（G. Martin；Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7634, 1981；M. J. Evansら；Nature, 292, 154, 1981）、または胎児初代培養繊維芽細胞（Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲティング、ES細胞を用いた変異マウスの作製、羊土社（1995））が産生している因子を添加した培地を用いることで、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導すること

もできる。

【0060】

上記方法により、本発明の外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞を得ることができる。本発明の方法により、胚性幹細胞は外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞へ分化誘導され、本発明の分化誘導法に供した胚性幹細胞の5%以上、好ましくは15%以上、より好ましくは40%以上、さらに好ましくは80%以上を外胚葉系の細胞（外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞）へ分化誘導することができる。

【0061】

1. ストローマ細胞の調製

本発明において、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する方法に用いるストローマ細胞としては、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞への分化を誘導する活性を有していればいずれも用いることができる。具体的には、

(a) 胎児初代培養繊維芽細胞 (Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995))、

(b) SIHMマウス由来のSTO細胞 (G. Martin; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7634, 1981; M. J. Evansら; Nature, 292, 154, 1981)、

(c) マウス胎児由来のNIH/3T3細胞 (J. L. Jainchillら; J. Virol., 4, 549, 1969)、

(d) M-CSF欠損マウス頭蓋冠由来のOP9細胞 (T. Nakanoら; Science, 272, 722, 1996)、

(e) マウス頭蓋冠由来のMC3T3-G2/PA6細胞 (H. Kodamaら; J. Cell. Physiol., 112, 89, 1982)、

(f) 既に多分化能を有していることが証明されている胚性幹細胞 (Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Har

bor Laboratory Press (1994)) から分化誘導し得られるストローマ細胞、あるいは

(g) 各種ストローマ細胞への分化能を有していることが示されている骨髓間葉系幹細胞 (Science, 284, 143, 1999) から分化誘導し得られるストローマ細胞を挙げることができる。

上記の中でも、好ましくは上記 (c)、(d)、(e) のストローマ細胞であり、より好ましくは (e) のストローマ細胞である。

【0062】

ストローマ細胞の培養は、樹立された際に用いられた方法を用いて継代培養することが好ましい。また、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)、Methods in Enzymology volume 225, Guide to Techniques in Mouse Development, Academic Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995)) 等に記載の胚性幹細胞の培養に用いるフィーダー細胞を培養するための方法を用いることもでき、例えば、Dulbecco MEM培地 (GIBCOBRL社製) に10%のウシ胎児血清 (GIBCOBRL社製)、2mMグルタミン、50U/mlペニシリン、および50U/mlストレプトマイシンを加えた培地を用いて培養することができる。

【0063】

上述のストローマ細胞を、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する培養に用いる場合、培養皿等の適当な支持体上で増殖させたストローマ細胞を生きたまま用いても良いし、物理化学的处理を施すことにより増殖能力を失った細胞を用いても良い。物理化学的处理を施すことにより増殖能力を失った細胞とは、もはや遺伝子複製を伴う次世代子孫の形成能力が失われている細胞であり、具体的には、抗癌剤を含む培地を用いた培養、致死量の放射線照射、あるいは病理診断に用いられる組織固定のための处理を施すことにより得られた細胞である。

【0064】

生きたままのストローマ細胞は、例えば、前日に培地交換を行ない細胞密度が

ほぼコンフルエント状態にまで達した細胞を、りん酸緩衝生理食塩水溶液（以下、PBSと称す）で数回洗浄後、後述の7で得られる本発明の培地（例えば、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する培養に用いる無血清培地）を加えることで調製することができる。また、ほぼコンフルエントに達した細胞を適当な消化酵素（例えば、0.02% EDTAを含み、0.05～0.25%のトリプシンあるいはアクチナーゼを含むPBS）で消化して回収し、後述の6で得られる本発明の培地（例えば、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する培養に用いる無血清培地）に懸濁後、培養器（例えば、0～1%、好ましくは0.1%ゼラチンでコートした組織培養皿）に播種し約1日間培養することによっても調製することができる。

【0065】

抗癌剤を含む培地を用いた培養により、増殖能力を失ったストローマ細胞は、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング、ES細胞を用いた変異マウスの作製、羊土社（1995）等に記載の方法を用い、調製することができる。例えば、前日に培地交換を行ない細胞密度がほぼコンフルエント状態にまで達した細胞を、1～100 μ g/ml、好ましくは10 μ g/mlの濃度のマイトマイシンCを含む培地で数時間、好ましくは2～3時間培養し、PBSで数回洗浄し、適当な消化酵素（例えば、0.02% EDTAを含み、0.05～0.25%のトリプシンあるいはアクチナーゼを含むPBS）で消化して回収し、後述の6で得られる本発明の培地（例えば、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する培養に用いる無血清培地）に懸濁後、培養器（例えば、0～1%、好ましくは0.1%ゼラチンでコートした組織培養皿）に播種し約1日間培養することによって調製することができる。また、マイトマイシンCの代わりに他の抗癌剤、例えば5-フルオロウラシル、アドリアマイシン、アラCまたはメトトレキセートなどの抗癌剤を、生体に用いる日本薬局方記載の濃度の10分の1～10倍、好ましくは1倍の濃度で用いることでも、増殖能力を失ったストローマ細胞を調製する

ことができる。

【0066】

致死量の放射線照射によって増殖能力を失ったストローマ細胞は、組織培養の技術、朝倉書店（1982）、組織培養の技術（第二版）、朝倉書店（1988）、組織培養の技術（第三版）、朝倉書店（1996）等に記載の方法を用い、調製することができる。例えば、前日に培地交換を行ない細胞密度がほぼコンフルエント状態にまで達した細胞を、200～5,000ラド、好ましくは500～1,000ラドのX線あるいはγ線を照射し、PBSで数回洗浄後、後述の6で得られる本発明の培地（例えば、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を分化誘導する培養に用いる無血清培地）を加えることで調製できる。また、放射線照射を施した細胞を適当な消化酵素（例えば、0.02% EDTAを含み、0.05～0.25%のトリプシンあるいはアクチナーゼを含むPBS）で消化して回収し、後述の6で得られる本発明の培地（例えば、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を分化誘導する培養に用いる無血清培地）に懸濁後、培養器（例えば、0～1%、好ましくは0.1%ゼラチンでコートした組織培養皿）に播種し約1日間培養することによっても調製できる。

【0067】

病理診断に用いられる組織固定操作によって増殖能力を失ったストローマ細胞は、日本組織細胞化学会が編集し毎年発行している組織細胞化学、学際企画（1987-1999）、Basic Techniques for Transmission Electron Microscopy, Acad. Press（1986）、電子顕微鏡チャートマニュアル、医学出版センター（1993）等に記載の方法を用い、調製することができる。具体的には、マイクロウェーブ固定、急速凍結置換固定、グルタルアルデヒド固定、パラフォルムアルデヒド固定、ホルマリン固定、アセトン固定、ブアン固定、過ヨウ素酸固定、メタノール固定、またはオスミウム酸固定を行なうことによって調製できる。例えば、前日に培地交換を行ない細胞密度がほぼコンフルエント状態にまで達した細胞を、4℃で、0.1～50%、好ましくは1～10%、より好ましくは3～5%のパラフォルムアルデヒドを含む溶液中に、例えば数分間～数時間、好ましくは5分間～1時間、より好ましくは30分間浸潤し、PBSで数回洗浄することによって調製

することができる。

【0068】

2. 本発明の分化誘導剤とそれを含む医薬

(1) 本発明の分化誘導剤

本発明の分化誘導剤としては、上述のストローマ細胞あるいは後述のストローマ細胞由来の因子を有効成分として含有するものであれば、いずれの態様でもよい。具体的には、胚性幹細胞とストローマ細胞を培養できる培地と上述のストローマ細胞を含むものが挙げられる。また、上述のストローマ細胞の細胞断片や培養上清も分化誘導剤の有効成分として挙げられる。

【0069】

ここで、上述のストローマ細胞の培養上清としては、胚性幹細胞を外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有する上述のストローマ細胞を培地中で培養して得られた培養上清、あるいは該ストローマ細胞をムコ多糖を含む培地中で培養して得られた培養上清を挙げることができる。

ここで、ムコ多糖としては、様々なストローマ細胞が産生する、胚性幹細胞を外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有する因子に結合する能力を有しているものであればいかなるものでも用いることができるが、例えばペパリンなどが好ましい。ヘパリンとしては市販されている公知のヘパリンを用いることができる。上記培養上清は、ヘパリンを数 ng/ml ～数千 ng/ml 、好ましくは数百 ng/ml の範囲で含む培地を用い、上述のストローマ細胞を5分から数日間培養することで調整することができる。このようにして得られた培養上清は、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する分化誘導剤や、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性因子取得の際に有効に用いることができる。

また、ムコ多糖、例えばペパリンは、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性因子に特異的相互作用する性質を有していると考えられるので、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程における調節に関連する物質の評価方法やスクリーニング方法、あるいは外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能の調節に関連する物質の評価方法やスクリ

ーニング方法に有効に用いることができる。

外胚葉系細胞から表皮系細胞への分化誘導剤としては、BMP 4 を含むことが好ましい。

【 0 0 7 0 】

(2) 本発明の分化誘導剤を含む医薬

本発明の分化誘導剤は、外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の治療薬として用いることができる。

外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患としては、神経系細胞の障害に基づく疾患あるいは表皮系細胞の障害に基づく疾患が挙げられる。

【 0 0 7 1 】

神経系細胞の障害に基づく疾患としては、アルツハイマー病、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、虚血性脳疾患、てんかん、脳外傷、背堆損傷、運動神経疾患、神経変性疾患、網膜色素変性症、内耳性難聴、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、神経毒物の障害に起因する疾患などが、表皮系細胞の障害に基づく疾患としては、火傷、外傷、創傷治癒、床擦れ、乾せんなどが挙げられる。

【 0 0 7 2 】

本発明の分化誘導剤を有効成分として含有する医薬は、該有効成分を単独で投与することも可能ではあるが、通常は該有効成分を薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。好ましくは水、あるいは食塩、グリシン、グルコース、ヒトアルブミン等の水溶液等の水性担体に溶解した無菌的な溶液が用いられる。また、製剤溶液を生理的条件に近づけるための緩衝化剤や等張化剤のような、薬理学的に許容される添加剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カリウム、クエン酸ナトリウム等を添加することもできる。また、凍結乾燥して貯蔵し、使用時に適当な溶媒に溶解させて用いることもできる。

【 0 0 7 3 】

投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、あるいは口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与

をあげることができる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

【0074】

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。例えば乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0075】

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該抗原そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗原を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗原および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g/kg}$ ～ 8mg/kg である。

【0076】

3. 本発明におけるストローマ細胞を認識する抗体の取得方法

本発明におけるストローマ細胞を免疫原として用いることにより、ポリクロー

ナル抗体、モノクローナル抗体等、本発明におけるストローマ細胞を認識する抗体を作製することができる。細胞を免疫原として用い、免疫原として用いた細胞の細胞表面特異的な抗体およびその抗体が認識する抗原分子を取得した報告はこれまでに数多くなされており (N. Itohら; Cell, 66, 233, 1991)、多くの細胞表面抗原分子が同定されCD抗原として知られている。

【0077】

現在では、蛋白質やペプチドを免疫原として抗体を作製する場合と同様、細胞を免疫原として細胞表面分子を認識する抗体を作製する手法が確立されており、例えば以下の方法により本発明におけるストローマ細胞を認識する抗体を調製することができる。

【0078】

(1) ポリクローナル抗体の作製

本発明に用いるストローマ細胞を免疫原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、3～20週令のラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

該免疫原の投与量は動物1匹当たり $10^4 \sim 10^8$ 個の細胞あるいは該細胞から調製した細胞膜画分0.01～10mgが好ましい。

該免疫原は、適当なアジュバンド (例えば、フロインドの完全アジュバンド (Complete Freund's Adjuvant) または、水酸化アルミニウムゲル、百日咳菌ワクチンなど) とともに皮下、または腹腔内に投与する。

該免疫原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに3～10回行う。各投与後、3～7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた免疫原と反応することを酵素免疫測定法 (酵素免疫測定法 (ELISA法) : 医学書院刊 (1976年)、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))、あるいはフローサイトメーターを用いた方法 [Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press (1993)] 等で確認する。

【0079】

免疫原に用いた細胞の細胞膜成分は、既に多くの公知の方法を用いて調製できることが知られており、例えば、シヨ糖濃度の違いによる密度差を利用したJonesらの方法 (D. H. Jones and A. L. Matus; Biochim. Biophys. Acta., 356, 276, 1974) を用いて調製することができ、この細胞膜成分をコートしたプレートを用いて酵素免疫測定を行なうことができる。

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

【0080】

分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿 [Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)]、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

【0081】

(2) モノクローナル抗体の作製

(a) 抗体産性細胞の調製

免疫に用いた本発明におけるストローマ細胞に対し、その血清が十分な抗体価を示したマウスまたはラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したマウスまたはラットに免疫原として用いた細胞を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。

該脾臓をMEM培地 (日水製薬社製) 中で細断し、ピンセットでほぐし、1, 200 rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH 7.65) で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

【0082】

(b) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) 骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1 (以下、P3-U1と略す) [Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Europ. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)] 等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地 [RPMI-1640培地にグルタミン (1.5 mM)、2-メルカプトエタノール (5×10^{-5} M)、ジェンタマイシン ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) および牛胎児血清 (FCS) (CSL社製、10%) を加えた培地 (以下、正常培地という) に、さらに8-アザグアニン ($15 \mu\text{g}/\text{ml}$) を加えた培地] で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

【0083】

(c) ハイブリドーマの作製

(a) で取得した抗体産生細胞と (b) で取得した骨髓腫細胞をMEM培地またはPBS (リン酸二ナトリウム 1.83 g、リン酸一カリウム 0.21 g、食塩 7.65 g、蒸留水 1 リットル、pH 7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞: 骨髓腫細胞 = 5~10:1 になるよう混合し、1,200 rpm で5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、 10^8 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) 2 g、MEM 2 ml およびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7 ml を混合した溶液を 0.2~1 ml 添加し、さらに1~2分間毎にMEM培地 1~2 ml を数回添加する。

添加後、MEM培地を加えて全量が 50 ml になるように調製する。該調製液を 900 rpm で5分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地 [正常培地にヒポキサンチン (10^{-4} M)、チミジン (1.5×10^{-5} M) およびアミノプテリン (4×10^{-7} M) を加えた培地] 100 ml 中に懸濁す

る。

【0084】

該懸濁液を96穴培養用プレートに100 μ l/穴ずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で7～14日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとりアンチボディズ [Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)] 等に述べられている酵素免疫測定法、またはモノクローナルアンチボディズ [Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press (1993)] 等に述べられているフローサイトメーターを用いた方法により、本発明におけるストローマ細胞に特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

【0085】

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、免疫原に用いた本発明におけるストローマ細胞から調整した細胞膜画分を適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(d)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットまたは抗マウスイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明におけるストローマ細胞に特異的に反応するものを本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

【0086】

フローサイトメーターを用いた方法の具体例として、以下の方法を挙げることができる。

免疫原に用いた細胞をハイブリドーマ上清もしくは後述の(d)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチンあるいは蛍光物質等で標識した抗マウスまたは抗ラットイムノグロブリン抗体を反応させ、ビオチン標識した第二抗体を用いた場合には、さらに蛍光標識したアビジンと反応させた後にFACS等のフローサイトメーターを用いて染色の有無を確認し、本発明におけるストローマ細胞に特異的に反応するものを本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

【0087】

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し[1回目は、HT培地(HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する]、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株として選択する。

【0088】

(d)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理[2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン(Pristane) 0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する]した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、(c)で取得した本発明のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清より、ポリクローナルで用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

【0089】

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。蛋白質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

【0090】

4. 本発明の抗体が認識する抗原の取得

上記3で取得した本発明に用いたストローマ細胞を免疫原として得られた抗体は、多くの細胞表面に存在する抗原分子を認識する。そこで、得られた抗体を用いて、該抗体が認識する抗原分子を取得することができる。具体的には、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す) や Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、

モノクローナルアンチボディズ [Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press (1993)]、アンチボディエンジニアリング [Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1996)] 等に記載された発現クローニングの方法を用いることができ、例えば以下のように行なうことができる。

【 0 0 9 1 】

具体的には、本発明におけるストローマ細胞より cDNA を調製する。

該 cDNA を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製し cDNA ライブラリーを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、本発明におけるストローマ細胞が生産する遺伝子産物を産生する形質転換体を得る。

本発明の抗体と反応する遺伝子産物を産生する形質転換体を選択する。
選択した該形質転換体に導入した cDNA にコードされている遺伝子配列を決定することにより、本発明の抗体が認識する抗原分子を取得することができる。

以下に、詳細に説明する。

【 0 0 9 2 】

宿主細胞としては、ファージ、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、本発明の抗原分子をコードする DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【 0 0 9 3 】

第 1 に本発明におけるストローマ細胞から全 RNA を調製する。その方法としては、チオシアン酸グアニジン・トリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)]、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、実験医学、9, 1937 (1991)] などがあげられる。また、全 RNA から poly (A)⁺ RNA として mRNA を調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロース

カラム法（モレキュラー・クローニング第2版）等があげられる。さらに、Fast Track mRNA Isolation Kit（Invitrogen社）、Quick Prep mRNA Purification Kit（Pharmacia社）などのキットを用いることによりmRNAを調製することができる。

【0094】

調製したストローマ細胞mRNAからcDNAライブラリーを作製する方法としては、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばSuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning（Life Technologies社）、ZAP-cDNA Synthesis Kit（STRATAGENE社）を用いる方法などがあげられる。

【0095】

cDNAライブラリーを作製するためのベクターとしては、大腸菌K12株等の微生物中で自立複製でき、かつ宿主細胞において導入したcDNAを発現できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。

ファージを宿主細胞として用いる場合には、例えば、市販のキットRecombinant Phage Antibody System（Pharmacia社）を用いることで、調製したcDNAを導入した形質転換体を得ることができる。

【0096】

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、調整したcDNAを含有してなる組換えベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、cDNA遺伝子、転写終結配列、より構成されたベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0097】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（Pharmacia社）、pSE280、pSE380、pSE420（Invitrogen社）、pAX、pMEX（MOBITEC社）、pGEMEX-1（Promega社）、pQE

-8 (QIAGEN社)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-) (Stratagene社)、pTrs30 [Escherichia coli JM109/pTrs30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrs32 [Escherichia coli JM109/pTrs32 (FERM BP-5408) より調製]、pGHA2 [Escherichia coli IGHA2 (FERM B-400) より調製、特開昭60-221091]、pGKA2 [Escherichia coli IGKA2 (FERM BP-6798) より調製、特開昭60-221091]、pTerm2 (US4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX (Amersham Pharmacia Biotech社)、pETシステム (Novagen社) 等を挙げることができる。

【 0 0 9 8 】

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (P_{trp})、lacプロモーター、 P_L プロモーター、 P_R プロモーター、T7プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターをあげることができる。また P_{trp} を2つ直列させたプロモーター ($P_{trp} \times 2$)、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列であるシャインーダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

【 0 0 9 9 】

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY 3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli H B101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli N Y49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serrat

ia marcescens, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefacines, Brevibacterium immariophilum ATCC14068, Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066, Brevibacterium flavum ATCC14067, Brevibacterium lactofermentum ATCC13869, Corynebacterium glutamicum ATCC13032, Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870, Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354, Pseudomonas sp. D-01 10等をあげることができる。

【0100】

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-2483942)、またはGene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

【0101】

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)等をあげることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等をあげることができる。

【0102】

宿主細胞としては、サッカロミセス属、クリュイペロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces lactis, Trichosporon pullulans, Schwanniomyces alluvius等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzym

ol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriology, 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができる。

【 0 1 0 3 】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p c D N A I、p C D M 8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133, (1990)]、pAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8 [Nature, 329, 840, (1987)]、EBV Vector (Invitrogen社)、pRc/CMV2 (Invitrogen社)、pRc/RSV (Invitrogen社)、pZeoSV Vector (Invitrogen社)、p c D N A I/Amp (Invitrogen社)、pDisplayp (Invitrogen社)、REP4 (Invitrogen社)、pcDNA3.1 Vector (Invitrogen社)、pXT1 (Invitrogen社)、pSG5 (Invitrogen社)、pBK-CMV (Stratagene社)、pBK-RSV (Stratagene社)、pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、pAGE210等をあげることができる。

【 0 1 0 4 】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【 0 1 0 5 】

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299) 等をあげることができる。

【 0 1 0 6 】

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェク

ション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

【0107】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー *Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、*Bio/Technology*, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質を発現させることができる。

【0108】

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにInvitrogen社) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) 等を用いることができる。

【0109】

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞であるSf9、Sf21 [*Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、*Trichoplusiani*の卵巣細胞であるHigh 5 (Invitrogen社) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

【0110】

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを
用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモ
ーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。

【0111】

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラ
ナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることがで
きる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であれ
ばいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*)
(特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977)、エレクトロポレーション
法 (特開昭60-251887)、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (特許第2
606856、特許第2517813) 等をあげることができる。

【0112】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養することにより、導入した
cDNAがコードする遺伝子産物を発現させることができる。形質転換体を培地
に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことがで
きる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換
体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を
含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地の
いずれを用いてもよい。

【0113】

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラク
トース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール
などのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸ア
ンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、
その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンス

チープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

【0114】

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

【0115】

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中のpHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0116】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

【0117】

培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0118】

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 (Pharmingen社)、Sf-900 II SFM培地 (Life Technologies社)、ExCell400、ExCell405 (いずれもJRH Biosciences社)、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～7、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0119】

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ(MS)培地、ホワイト(White)培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 5～9、20～40℃の条件下で3～60日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0120】

上記のとおり、本発明におけるストローマ細胞から調整したcDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養することにより、該cDNAがコードしている遺伝子産物を発現する形質転換体を得ることができる。

【0121】

本発明の抗体と反応する遺伝子産物を産生する形質転換体を選択する方法としては、アンチボディズ [Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)]、モノクローナルアンチボディズ [Monoclon

al Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press (1993)]、アンチボディエンジニアリング [Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1996)]、酵素免疫測定法、第3版、医学書院 (1987) 等に述べられている酵素免疫測定法、アンチボディズ [Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)]、モノクローナルアンチボディズ [Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press (1993)]、アンチボディエンジニアリング [Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1996)]、Int. Immunol., 10, 275, (1998)、Exp. Hematol., 25, 972, (1997) 等に述べられているフローサイトメーターを用いた方法、またはモノクローナルアンチボディズ [Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press (1993)]、アンチボディエンジニアリング [Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1996)]、J. Immunol., 141, 2797, (1988)等に述べられているパニング法を挙げることができる。

【0122】

選択した形質転換体に導入した cDNA を単離する方法としては、宿主細胞において自立複製可能な発現ベクターを用いた場合には、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Mol. Cell. Biol., 8, 2837 (1988)等に記載の通常ファージベクター、プラスミドベクターを回収する方法、あるいは Hirt 法を挙げることができる。染色体中への組込れる発現ベクターの場合には、宿主細胞に導入する cDNA を複数種類 (例えば、100～1000種) からなる集団にプール分けし、目的とする形質転換体を与える集団を更に少ない種類 (例えば、10～100種) の cDNA からなる集団にプール分けすることを繰り返すことで、目的とする cDNA を単離することができる。

【0123】

単離した cDNA の塩基配列を末端から、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74

、5463 (1977)] あるいはABI PRISM 377 DNA シークエンサー (PE Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定することができる。

【0124】

以上のように、発現クローニングの方法を用いて、本発明の抗体が認識する抗原分子を取得することができる。

本発明では、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有していない細胞 (例えば、後述する実施例3において開示されている) を利用して発現クローニングを行なうことが好適である。

【0125】

具体的には、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞へ分化誘導する活性を有していない細胞を宿主細胞とし、本発明におけるストローマ細胞から調製したcDNAを導入して発現させ、本発明におけるストローマ細胞を認識する抗体を用いて選択する発現クローニングの手法が挙げられる。

【0126】

胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有していない細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣由来のCHO細胞 (T. T. Puckら; J. Exp. Med., 108, 945, 1985)、アフリカミドリザル腎臓由来のCOS細胞 (Y. Gluzman; Cell, 23, 175, 1981)、コッカスパニエル雌犬腎臓由来のMDCK細胞 (C. R. Gaushら; Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 122, 931, 1966; D. S. Misfeldtら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1212, 1976)、ラット繊維芽細胞3Y1 (S. Sandineyerら; Cancer Res., 41, 830, 1981) が挙げられる。したがって、宿主細胞として、CHO細胞、MDCK細胞、3Y1細胞、より好ましくはSV40系の発現ベクターを用いた発現クローニングに好適なCOS細胞を用いることが望ましい。

【0127】

発現クローニングの手法以外にも、本発明におけるストローマ細胞を認識する抗体を用いて、該抗体が認識する抗原分子を取得することができる。具体的には、本発明におけるストローマ細胞を出発原料とし、該抗体との反応性を上述の酵

素免疫測定法を用いて測定することを指標として精製することができる。

【0128】

具体的には、本発明におけるストローマ細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル、界面活性剤処理等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化成社) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia社) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、抗原精製標品を得ることができる。

【0129】

5. 胚性幹細胞の調製

前述の如く、本発明における胚性幹細胞としては、(a)、(b) 及び (c) を例示することができる。以下に、これら (a)、(b) 及び (c) の胚性幹細胞の作製法を具体的に説明する。

(1) 着床以前の初期胚を培養することによって樹立した胚性幹細胞の作製

着床以前の初期胚を、文献 [Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)] に記載された方法に従って培養することで、該初期胚より胚性幹細胞を調製することができる。

【0130】

(2) 体細胞の核を核移植した胚性幹細胞の作製

哺乳類動物細胞の体細胞の核を移植し正常な発生を開始した卵は、Wilmutら (Nature, 385, 810, 1997)、Cibelliら (Science, 280, 1256, 1998)、入谷明ら (蛋白核酸酵素, 44, 892, 1999)、Baguisiら (Nature Biotechnology, 17,

456, 1999)、Wakayamaら (Nature, 394, 369, 1998; Nature Genetics, 22, 127, 1999; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 14984, 1999)、; Rideout IIIら (Nature Genetics, 24, 109, 2000) 等によって報告された方法を用いて、例えば以下のように作製することができる。

【0131】

哺乳類動物細胞の核を摘出後初期化（核を再び発生を繰り返すことができるような状態に戻す操作）し、除核した哺乳動物の未受精卵に注入する方法を用いて発生を開始させ、発生を開始した卵を培養することによって、他の体細胞の核を有し、かつ正常な発生を開始した卵が得られる。

【0132】

体細胞の核を初期化する方法としては複数の方法が知られている。例えば、以下の方法が知られている。

核を提供する側の細胞を培養している培地を、5～30%、好ましくは10%の仔ウシ胎児血清を含む培地（例えば、M2培地）から3～10日、好ましくは5日間、0～1%、好ましくは0.5%の仔ウシ胎児血清を含む貧栄養培地に変えて培養することで細胞周期を休止期状態（G0期もしくはG1期）に誘導することで初期化することができる。この方法は、哺乳動物が、例えばヒツジ、ヤギ、ウシなどの場合に好適である。また、同種の哺乳動物の除核した未受精卵に、核を提供する側の細胞の核を注入し数時間、好ましくは約1～6時間培養することで初期化することができる。この方法は、哺乳動物が、例えばマウスなどの場合に好適である。

【0133】

初期化された核は除核された未受精卵中で発生を開始することが可能となる。初期化された核を除核された未受精卵中で発生を開始させる方法としては複数の方法が知られている。細胞周期を休止期状態（G0期もしくはG1期）に誘導し初期化した核を、電気融合法などによって同種の哺乳動物の除核した未受精卵に移植することで卵子を活性化し発生を開始させることができる。この方法は、哺乳動物が、例えばヒツジ、ヤギ、ウシなどの場合に好適である。同種の哺乳動物の除核した未受精卵に核を注入することで初期化した核を、再度マイクロマニピュレ

ーターを用いた方法などによって同種の哺乳動物の除核した未受精卵に移植し、卵子活性化物質（例えば、ストロンチウムなど）で刺激後、細胞分裂の阻害物質（例えば、サイトカラシンBなど）で処理し第二極体の放出を抑制することで発生を開始させることができる。この方法は、哺乳動物が、例えばマウスなどの場合に好適である。

【0134】

いったん発生を開始した卵が得られれば、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, E S細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995)) 等に記載の公知の方法を用い、胚性幹細胞を取得することができる。

【0135】

(3) 染色体上の遺伝子を改変した胚性幹細胞の作製

相同組換え技術を用いることによって、染色体上の遺伝子を改変した胚性幹細胞を作製することができる。

例えば、改変する染色体上の遺伝子としては、組織適合性抗原の遺伝子、神経系細胞または表皮系細胞の障害に基づく疾患関連遺伝子などが挙げられる。

染色体上の標的遺伝子の改変は、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, E S細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995)) 等に記載の方法を用い、例えば以下のように行なうことができる。

【0136】

改変する標的遺伝子（例えば、組織適合性抗原の遺伝子や疾患関連遺伝子など）のゲノム遺伝子を単離する。

単離したゲノム遺伝子を用いて標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。

作製したターゲットベクターを胚性幹細胞に導入し、標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、染色体上の遺伝子を改変した胚性幹細胞を作製することができる。

【0137】

標的遺伝子のゲノム遺伝子を単離する方法としては、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノムDNAライブラリースクリーニングシステム (Genome Systems社) やUniversal GenomeWalkerTM Kits (CLONTech社) などを用いることにより、標的遺伝子のゲノム遺伝子を単離することができる。

標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995)) 等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型、インサクション型いずれでも用いることができる。

【0138】

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995)) 等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリA選択などの方法を用いることができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーション法 (モレキュラー・クローニング第2版) やPCR法 [PCR Protocols, Academic Press (1990)] 等が挙げられる。

【0139】

6. 培地の調製

本発明の、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する方法で用いる培地とは、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製

することができる。

基礎培地としては、BME培地 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 89, 362, 1965)、BGJb培地 (Exp. Cell Res., 25, 41, 1961)、CMRL 1066培地 (N. Y. Academy of Sciences, 5, 303, 1957)、Glasgow MEM培地 (Virology, 16, 147, 1962)、Improved MEM Zinc Option培地 (J. National Cancer Inst., 49, 1705, 1972)、IMDM培地 (In Vitro, 9, 6, 1970)、Medium 199培地 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1, 1950)、Eagle MEM培地 (Science, 130, 432, 1959)、Alpha MEM培地 (Nature New Biology, 230, 310, 1971)、Dulbecco MEM培地 (Virology, 8, 396, 1959)、ハム培地 (Exp. Cell Res., 29, 515, 1963; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53, 288, 1965)、RPMI 1640培地 (J. A. M. A., 199, 519, 1967)、Fischer's培地 (Methods in Med. Res., 10, 1964)、McCoy's培地 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 100, 115, 1959)、ウイリアムスE培地 (Exp. Cell Res., 69, 106, 1971; Exp. Cell Res., 89, 139, 1974) およびこれらの混合培地など、動物細胞の培養に用いることのできる培地であればいずれも基礎培地として用いることができる。

【 0 1 4 0 】

また、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)、Methods in Enzymology volume 225, Guide to Techniques in Mouse Development, Academic Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995)等に記載の胚培養のための培地、例えば、M2培地、M16培地、Whitten培地、体外受精用培地など、胚の培養に用いることのできる培地であればいずれも基礎培地として用いることができる。

【 0 1 4 1 】

さらに、これら基礎培地に、血清代替物としての各種増殖因子を添加した培地、ストローマ細胞などが産生する因子を添加した培地、あるいは無蛋白培地であって、動物細胞や胚の培養が可能であるものであればいずれも用いることができる。その具体的例として、市販のKNOCKOUTTM SRを添加した無血清培地 (M. D. Goldsboroughら; Focus, 20, 8, 1998)、インスリンおよびトランスフェリンを

添加した無血清培地 [例えば、CHO-S-SFM II (GIBCOBRL社製)、Hybridoma-SFM (GIBCOBRL社製)、eRDF Dry Powdered Media (GIBCOBRL社製)、UltraCULTURE™ (BioWhittaker社製)、UltraDOMA™ (BioWhittaker社製)、UltraCHO™ (BioWhittaker社製)、UltraMDCK™ (BioWhittaker社製)、ITPSG培地 (S. Hosoiら; Cytotechnology, 5, S17, 1991)、ITSFn培地 (A. Rizzino and C. Growley; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 457, 1980)、mN3培地 (S. Okabeら; Mech. Dev., 59, 89, 1996) など]、細胞由来の因子を添加した培地 [例えば、多能性奇形癌腫細胞PSA1の培養上清を添加した培地 (G. R. Martin; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7634, 1981)、上記1に記載のストローマ細胞の培養上清を含む培地、上記1に記載のストローマ細胞が産生する因子を含む培地、上記4で得られた抗原成分を含む培地、骨形成因子4 (Bone Morphogenetic Protein 4、以下「BMP4」という) を含む培地など]、または無蛋白培地 (例えば、CD-CHO (GIBCOBRL社製)、PFHM-II (GIBCOBRL社製)、UltraDOMA-PF™ (BioWhittaker社製) など) が挙げられる。

【0142】

7. 本発明の分化誘導法、細胞、抗体、抗原および分化誘導剤の利用

(1) 本発明の分化誘導方法を利用した物質の評価またはスクリーニング方法

本発明の、胚性幹細胞を外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞へ分化誘導する培養方法は、これら細胞の分化過程あるいは細胞の機能調節における生理活性物質 (例えば、薬物) や機能未知の新規遺伝子産物などの薬理評価および活性評価に有用である。また、特定の遺伝子を改変した胚性幹細胞を用いることにより、胚性幹細胞が外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞へ分化していく過程における、該遺伝子の機能評価にも有用である。

【0143】

本発明の培養法の利用方法としては、例えば、以下のものが挙げられる。

本発明の分化誘導方法を用いることにより、培地中に添加した被検物質の外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞への分化の過程、または外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞の機能調節に及ぼす影響を評価することができる。被検物質としては、培養系に加えることができるものであればどのようなものでもよく、例え

ば、低分子化合物、高分子化合物、有機化合物、無機化合物、蛋白質、遺伝子、ウイルス、細胞などが挙げられる。遺伝子を除く被検物質は、培養培地中に直接添加すればよい。

【 0 1 4 4 】

遺伝子を効率的に培養系に導入する方法としては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス等のウイルスベクターに乗せて培養系に添加する方法、またはリポソームなどの人工的なベジクル構造に封入して培養系に添加する方法などが挙げられる。その具体的例としては、組換えウイルスベクターを用いた遺伝子解析に関する報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733, 1995; Nucleic Acids Res., 18, 3587, 1990; Nucleic Acids Res., 23, 3816, 1995) を挙げることができる。

これらの被検物質は、上記分化誘導法における培養系にどのような時期でも添加することができ、例えば、幹細胞が外胚葉細胞へ分化する過程に対する作用を評価したい場合には比較的培養の初期に、外胚葉細胞から外胚葉由来の細胞に分化する過程に対する作用を評価したい場合には比較的培養の後期に被検物質を添加することで評価することができる。培養系において分化の程度を判断するには、胚性幹細胞から分化の結果生じる各種分化細胞のマーカー蛋白質の発現を調べることで把握することができる。被検物質の評価あるいはスクリーニングは、所定時間の培養後、例えば、外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞への分化効率の質的または量的な変化を測定することで行なうことができる。質的な変化の測定方法としては、具体的には、van Inzenらが胚性幹細胞から分化誘導した神経細胞を用いて活動電位を測定した例が挙げられる (Biochim. Biophys. Acta., 1312, 21, 1996)。

【 0 1 4 5 】

(2) 本発明の細胞を含有する医薬

本発明で用いるストローマ細胞あるいは本発明のストローマ細胞由来の因子、またはそれらにより胚性幹細胞を分化誘導して得られた外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞は、外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の治療、診断あるいは予防のための医薬として用いることができる。

外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患としては、前述の 2. (2) に記載された各種疾患が挙げられる。

【0146】

外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の治療薬としては、移植医療に利用可能な、障害を受けた細胞の機能と同じ機能を有する細胞、障害を受けた細胞の前駆細胞、障害を受けた細胞の機能を代償する細胞、障害を受けた細胞の再生を促進する機能を有する細胞が用いられる。

本発明の治療薬は、本発明の方法を用いることにより、胚性幹細胞より分化誘導した外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を精製することにより製造できる。また、上記 1. の方法でストローマ細胞を、後述 8. の方法でストローマ細胞由来の因子を調製することができる。該ストローマ細胞は、外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患において、障害を受けた細胞の再生を促進させる機能を有する細胞として治療薬となりうる。また、該ストローマ細胞由来の因子は、障害を受けた外胚葉由来の細胞の再生因子として治療薬になりうる。

【0147】

細胞の純度を高める方法は、公知となっている細胞分離精製の方法であればいずれも用いることができるが、その具体的例として、アンチボディズ [Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)]、モノクローナルアンチボディズ [Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press (1993)]、アンチボディエンジニアリング [Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1996)]、Int. Immunol., 10, 275, (1998)、Exp. Hematol., 25, 972, (1997) 等に述べられているフローサイトメーターを用いた方法、モノクローナルアンチボディズ [Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press (1993)]、アンチボディエンジニアリング [Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1996)]、J. Immunol., 141, 2797, (1988) 等に述べられているパニング法、組織培養の技術 (第三版), 朝倉書店 (1996) 等に記載のシヨ糖濃度の密度差を利用した細胞分画法を挙げることができる。

【0148】

本発明の分化細胞の純度を高める方法は、上述のような胚性幹細胞を分化誘導して得られた外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞を、抗癌剤を含む培地中で培養する工程を含む。これにより、未分化な状態の細胞を除去することができ、より純度の高い分化細胞を得ることが可能で、医薬としてより好適となる。即ち、抗癌剤で処理することにより、目的とする分化細胞以外の細胞、例えば未分化な細胞を除去することができる。このような未分化細胞は奇形腫瘍テラトーマの原因になることが危惧されるが、抗癌剤で処理することでその危険性を回避できる。

ここで、抗癌剤としては、マイトマイシンC、5-フルオロウラシル、アドリアマイシン、アラCまたはメトトレキセートなどが挙げられる。これら抗癌剤は、分化誘導した細胞よりも未分化な状態の細胞に、より細胞毒性を示す濃度で用いることが好ましい。具体的には、上述の1.に記載した方法にしたがい、これら抗癌剤を用いた培養を行い、至適濃度を決定することができ、例えば、これら抗癌剤を生体に用いる日本薬局方記載の濃度の100分の1～1倍の濃度で含む培地を用い、5%の二酸化炭素を通気したCO₂インキュベーターで、37℃で数時間、好ましくは2時間培養する方法を挙げることができる。

ここで使用する培地としては、分化誘導した細胞を培養することが可能な培地であればいかなるものも用いることができる。具体的には、上述の6.に記載の培地等を挙げることができる。また、これら抗癌剤は、分化誘導した細胞に上述の1.に記載した方法にしたがって使用することができる。

【0149】

本発明の治療薬は、上記の細胞（外胚葉細胞又は外胚葉由来の細胞、ストローマ細胞を含む）に、薬理学的に許容される生理食塩水、添加剤および／または培地を含んでも構わないが、移植医療の目的に用いられるため、血清やウイルス等の不純物の混入が無いことが好ましい。上記因子を含む治療薬は、後述する7（4）の方法により製造するが、細胞の治療薬と同様に血清やウイルス等の不純物の混入がないことが好ましい。本発明の方法によれば、無血清培養条件下で、また、非生理的な濃度のレチノイン酸等の分化誘導剤を用いる必要もなく、外胚葉

細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導することができ、移植医療に有用である。

【0150】

移植医療においては、組織適合性抗原の違いによる拒絶がしばしば問題となるが、前述の5（2）に記載の体細胞の核を核移植した胚性幹細胞あるいは前述の5（3）に記載の染色体上の遺伝子を改変した胚性幹細胞を用いることで克服できる。

また、前述の5（2）に記載の体細胞の核を核移植した胚性幹細胞を用いて分化誘導するこ

とで、体細胞を提供した個人の外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を得ることができる。このような個人の細胞は、その細胞自身が移植医療として有効のみならず、既存の薬物がその個人に有効か否かを判断する診断材料としても有用である。さらに、分化誘導した細胞を長期に培養することで酸化ストレスや老化に対する感受性の判定が可能であり、他の個体由来の細胞と機能や寿命を比較することで神経変性疾患等の疾患に対する個人のリスクを評価することができ、それら評価データは将来の発病率が高いと診断される疾患の効果的な予防法を提供するために有用である。

【0151】

移植の方法としては、対象となる疾患に適した方法であればいずれの方法も用いることができ、疾患ごとにそれぞれの疾患に適した公知の方法が知られている。例えば、疾患患者より胚性幹細胞を取得し、ストローマ細胞およびストローマ細胞由来の因子を加えて、得られた胚性幹細胞を培養する。該胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を分化誘導させたのちに、患者の疾患部位に移植することにより疾患を治療することができる。または、ストローマ細胞およびストローマ細胞由来の因子を疾患患者の疾患部位に直接投与しても疾患を治療することができる。具体的に、パーキンソン病患者に対する中絶胎児の脳細胞を移植する方法としては、Nature Neuroscience 2, 1137, 1999等に記載の方法が挙げられる。

【0152】

(3) 本発明の抗体を用いて本発明の抗原を免疫学的に検出する方法、および本発明の抗体を含有する医薬

本発明の、胚性幹細胞から外胚葉細胞又は外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞を特異的に認識する抗体を用い、抗原抗体反応を行わせることにより、本発明の抗原または該抗原を含む組織を免疫学的に検出することができる。該検出法及び該抗体を含む医薬は、外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患など、該ストローマ細胞の機能の低下あるいは消失に起因する疾患の診断に利用することができる。また、該検出方法は、抗原の定量にも用いられる。

外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患としては、前述の2. (2)に記載の各種疾患が挙げられる。

【0153】

免疫学的に検出する方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法・蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法等があげられる。免疫学的に定量する方法としては、液相中で本発明の抗原と反応する抗体のうちエピトープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法、 ^{125}I 等の放射性同位体で標識した本発明の抗原と本発明の抗原を認識する抗体とを用いるラジオイムノアッセイ法等があげられる。

【0154】

(4) 本発明の抗原を含有する医薬

本発明の抗体が認識する、胚性幹細胞から外胚葉細胞又は外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞で特異的に発現している抗原分子は、外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の治療薬として用いることができる。

外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患としては、前述の2. (2)に記載の各種疾患が挙げられる。

【0155】

本発明の抗原を有効成分として含有する医薬を有効成分として含有する医薬は、該有効成分を単独で投与することも可能ではあるが、通常は該有効成分を薬理的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが

望ましい。これらの医薬製剤の形態、投与経路、投与量、使用形態等は、前述の 2. (2) に記載の医薬製剤の形態、投与経路、投与量、使用形態等が挙げられる。

【0156】

8. 胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞由来の因子を取得する方法

本発明におけるストローマ細胞より、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有する因子を取得することができる。具体的には、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す) や Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、モノクローナルアンチボディズ [Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press (1993)]、アンチボディエンジニアリング [Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1996)] 等に記載された発現クローニングの方法を用いることができ、例えば以下のように行なうことができる。

【0157】

具体的には、本発明におけるストローマ細胞より cDNA を調製する。

該 cDNA を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製し cDNA ライブラリーを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、本発明におけるストローマ細胞が生産する遺伝子産物を産生する形質転換体を得る。

胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有する遺伝子産物を産生する形質転換体を選択する。

選択した該形質転換体に導入した cDNA にコードされている遺伝子配列を決定することにより、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有する因子を取得することができる。以下に、詳細に説明する。

【0158】

宿主細胞としては、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有していない細胞が好ましい。具体的には、チャイニーズハムスター卵巢由来のCHO細胞 (T. T. Puckら; J. Exp. Med., 108, 945, 1985)、コッカスパニエル雌犬腎臓由来のMDCK細胞 (C. R. Gaushら; Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 122, 931, 1966; D. S. Misfeldtら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1212, 1976)、ラット繊維芽細胞3Y1 (S. Sandineyerら; Cancer Res., 41, 830, 1981)、アフリカミドリザル腎臓由来のCOS細胞 (Y. Gluzman; Cell, 23, 175, 1981) が挙げられる。これら宿主細胞の中でも、SV40系の発現ベクターを用いた発現クローニングに好適なCOS細胞がより好ましい。

【0159】

cDNAの作製に用いる細胞としては、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞が好ましい。具体的には、胎児初代培養繊維芽細胞 (Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995))、SIHMマウス由来のSTO細胞 (G. Martin; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7634, 1981; M. J. Evansら; Nature, 292, 154, 1981)、より好ましくはマウス胎児由来のNIH/3T3細胞 (J. L. Jainchillら; J. Virol., 4, 549, 1969)、M-CSF欠損マウス頭蓋冠由来のOP9細胞 (T. Nakanoら; Science, 272, 722, 1996)、マウス頭蓋冠由来のMC3T3-G2/PA6細胞 (H. Kodamaら; J. Cell. Physiol., 112, 89, 1982) を挙げることができる。

【0160】

cDNAライブラリーを調製する方法としては、上記4に記載した方法が挙げられる。作製したcDNAライブラリーをそのまま用いてもよいが、目的とする遺伝子を濃縮するために、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有していない細胞のmRNAを用い、サブトラクション法 (Proc. Natl. Acad

． Sci. USA, 85, 5783, 1988) を行なって作製した cDNA ライブラリーを用いることもできる。

組換えベクターの導入方法、形質転換体を得る方法、および得られた形質転換体を培地に培養する方法としては、上記 4 に記載した方法が挙げられる。

【0161】

本発明の分化誘導法において、胚性幹細胞と形質転換体との共培養を行なうことで、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有する遺伝子産物を産生する形質転換体を選択することができる。

選択した形質転換体に導入した cDNA を単離する方法、および単離した cDNA の遺伝子配列を決定する方法としては、上記 4 に記載した方法が挙げられる。

【0162】

発現クローニングの手法以外にも、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞由来の因子を取得することができる。具体的には、本発明におけるストローマ細胞を出発原料とし、培地中に添加した際の胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する促進効果を指標として精製することができる。精製方法としては、上記 4 に記載した方法が挙げられる。

更に、ストローマ細胞由来の因子は、ムコ多糖（例えば、ヘパリン）に吸着する性質を有しているので、ストローマ細胞を培養した培養系中、あるいはストローマ細胞存在下で胚性幹細胞を非凝集状態で培養した培養系中の該因子をムコ多糖と結合させ、その後ムコ多糖に結合した前記ストローマ細胞由来の因子から該因子を取得することができる。例えば、ヘパリンを担体とするカラムクロマトグラフィーを用いてストローマ細胞由来の因子をヘパリンに結合させ、その後その結合した該因子を溶出させ、前記分化誘導促進効果を指標に該因子を取得することができる。

本発明に係わる適用動物としては、脊椎動物、中でも温血動物、さらにはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ヤギ、サル、ヒト等の哺乳動物が挙げられる。

以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単な

る例示を示すものにすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

【 0 1 6 3 】

【実施例】

実施例 1 胚性幹細胞のドーパミン作動性神経細胞への分化

胚性幹細胞である E S 細胞 E B 5 (H. Niwa ら; Nature Genet., 24, 372, 200; 大阪大学医学部分子制御医学講座 丹羽仁史博士より恵与された) とストローマ細胞である M C 3 T 3 - G 2 / P A 6 細胞 (H. Kodama ら; J. Cell Physiol., 112, 89, 1982、以下、P A 6 細胞と略す) またはマウス胎児初代培養繊維芽細胞 (以下、M E F 細胞と略す) との共培養を行なった。

E S 細胞 E B 5 は未分化特異的プロモーター (Oct3 プロモーター; E. Pikarsky ら; Mol. Cell. Biol., 14, 1026, 1994) 下に薬剤耐性遺伝子 Blastocidine-R が発現するように遺伝子導入されており、Blastocidine 20 μ g/ml を添加して培養することで、未分化な E S 細胞のみを選択し、培養維持することができる。本発明で用いた E S 細胞 E B 5 は、試験期間中、Blastocidine 20 μ g/ml を添加した培地中で生存し、未分化な状態を保っていることを確認して用いた。

E S 細胞 E B 5 は、Dulbecco MEM 培地に 10% の牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum, ES Cell-Qualified; ライテックオリエンタル株式会社製)、2 mM グルタミン、100 μ M MEM Non-Essential Amino Acids 溶液、50 U/ml ペニシリン、50 U/ml ストレプトマイシン、100 μ M 2-メルカプトエタノール、および 1,000 U/ml L I F (ESGRO Murine LIF; ライテックオリエンタル株式会社製) を加えた培地を用い、ゼラチンコートしたプラスチック培養皿上で Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) に記載の方法に従って未分化な形質を保ちながら培養した。

【 0 1 6 4 】

P A 6 細胞は、10% 牛胎児血清 (GIBCO-BRL 社製) を含む α MEM 培地を用い、児玉らの方法 (H. Kodama ら; J. Cell Physiol., 112, 89, 1982) に従って培養した。

M E F 細胞は、Dulbecco MEM 培地に 10% の牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum

、ES Cell-Qualified; ライテックオリエンタル株式会社製)、2 mM グルタミン、50 U/ml ペニシリンおよび50 U/ml ストレプトマイシンを加えた培地を用い、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1994)に記載の方法に従って調整し、培養した。

【0165】

単一細胞状態としたES細胞と、PA6細胞またはMEF細胞とを共培養することで、ES細胞を分化誘導させた。

単一細胞状態としたES細胞EB5の調整は、以下のように行った。あらかじめ培地交換を行ない、ES細胞EB5を30%コンフルエント状態にまで増殖させた。培地を除き、PBS(-)を用いて2回洗浄した後、1 mM EDTA および0.25%トリプシンを含むPBS(-)を加え37℃で20分間培養した。該培養液を、Glasgow MEM培地に10%KNOCKOUT SR (GIBCOBRL社製)、2 mM グルタミン、100 μ M MEM Non-Essential Amino Acids溶液、1 mM ピルビン酸、50 U/ml ペニシリン、50 U/ml ストレプトマイシンおよび100 μ M 2-メルカプトエタノールを加えた培地(以下、無血清培地と略す)にけん濁し、該けん濁液を、4℃、200×gで5分間遠心分離を行なった。沈殿した細胞を再び無血清培地にけん濁することで単一細胞状態のES細胞EB5を調製した。

【0166】

PA6細胞またはMEF細胞は、あらかじめ培地交換を行ない細胞密度がほぼコンフルエント状態にまで達した細胞を、PBS(-)で2回洗浄後、上述の無血清培地を加えることでフィーダー細胞として調製した。

【0167】

調製したPA6細胞が培養されている培養器に、単一細胞状態に調整したES細胞EB5を10~100細胞/ cm^2 の細胞密度で播種し、4日目、6日目、7日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、37℃で5%の二酸化炭素を通気したCO₂インキュベーターにて8日間培養した。コントロールとしてゼラチンコートしただけの培養器に上記のES細胞を同様に播種し同様に培養した。

8日間培養後、培養器内の培地を除き、4%パラフォルムアルデヒド溶液を加え30分間固定した。固定した細胞を、代表的な神経マーカーであるNCAMに対する抗体（Chemicon社製、以下、抗NCAM抗体）、神経特異的なマーカーであるクラスIIIβチューブリンに対する抗体（Babco社製、以下、抗チューブリン抗体）、神経前駆細胞特異的なマーカーであるネスチンに対する抗体（PharMingen社製、以下、抗ネスチン抗体）を用い、Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999) に記載の方法に従って免疫染色を行なった。

上記と同様の方法で、10日間培養後、培養器内の細胞を固定後、ドーパミン作動性神経のマーカーであるチロシン水酸化酵素に対する抗体（Chemicon社製）、コリン作動性神経のマーカーであるVAchTに対する抗体（Cheminco社製）、GABA作動性神経のマーカーであるGADに対する抗体（Chemicon社製）、セロトニン作動性神経のマーカーであるセロトニンに対する抗体（Dia Sorin社製）あるいはノルアドレナリン神経マーカーであるドーパミンβ水酸化酵素に対する抗体（PROTOS Biotech社製）を用いて免疫染色を行った。

培養器として組織培養用3cmデッシュ（プラスチック製、FALCON社製）を用い、1) PA6細胞をフィーダー細胞として調製したデッシュ、2) MEF細胞をフィーダー細胞として調製したデッシュ、3) ゼラチンコートしただけのデッシュのそれぞれに、200個のES細胞EB5を播種し培養した結果を図に示した。

単一細胞状態で播種されたES細胞EB5は互いに凝集することなくフィーダー細胞あるいはデッシュ表面に付着し、細胞分裂を繰り返しコロニーを形成した（以下、ES細胞由来のコロニーあるいは単にコロニーという）。

【0168】

図1はPA6細胞との共培養の結果、出現したコロニーを（A）抗NCAM抗体、（B）抗チューブリン抗体、（C）抗ネスチン抗体で染色した結果を示した。図2はMEF細胞との共培養の結果、出現したコロニーを抗NCAM抗体で染色した結果を示した。図3はPA6細胞との共培養の結果出現したコロニーをチロシン水酸化酵素に対する抗体（以下、抗チロシン水酸化酵素抗体）で染色した

結果を示した。図4はPA6細胞との共培養の結果出現したコロニーの中で各種マーカー陽性のコロニーの割合を経時的に示した。コロニーの割合は、上述の1)、2)、3)のそれぞれの条件で共培養を行ったデッシュを160枚ずつ用意し、出現した全てのコロニーの染色強度を顕微鏡で観察することによって算出した。

【0169】

条件1)のPA6細胞をフィーダー細胞として調製した共培養系ではES細胞EB5由来のコロニーの90% ($n=160$)は図1Aに示すようにNCAM強陽性であった。それらのコロニーでは抗チューブリン抗体(図1B)、抗ネスチン抗体(図1C)とも染色陽性であった。一方、条件2)のMEF細胞との共培養では有意の神経マーカーの出現が認められなかった(図2)。ゼラチンコートした培養器上で培養したコロニーも、条件2)のMEF細胞との共培養で出現したコロニーと同様の染色結果であった。条件1)のPA6細胞をフィーダー細胞として調製した共培養系では抗チロシン水酸化酵素抗体に陽性のES細胞由来のコロニーが高頻度に出現した(89%)(図3)。PA6細胞とES細胞EB5との共培養の結果、経時的には図4に示すように、共培養開始3日後からネスチン陽性のコロニーが、4日後からチューブリン陽性のコロニーが出現している。また、チロシン水酸化酵素陽性のコロニーは5日後から出現し、10日後でピークに達した。この間、ノルアドレナリン神経マーカーであるドーパミン β 水酸化酵素に対する抗体による免疫染色は陰性であった。10日後におけるコリン作動性神経のマーカーであるVAchT陽性のコロニーは5%, GABA作動性神経のマーカーであるGADに陽性のコロニーは15%, セロトニンに陽性のコロニーは4%であった。

なお、ES細胞として代表的な129系マウス由来のCCE細胞(M. R. Kuehnら; Nature, 326, 295, 1987; バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、ES細胞を用いた変異マウスの作製、羊土社、1995)を用いた共培養の場合にも上記と同様の結果が得られた。

【0170】

実施例2 胚性幹細胞の非神経系外胚葉細胞への分化

実施例 1 に記載の無血清培地に、0.5 nmol/l の BMP 4 (R&D 社製) を添加した培地を作製した。作製した BMP 4 添加無血清培地を実施例 1 で用いた無血清培地の代わりに用い、実施例 1 に記載した方法に従って ES 細胞 EB 5 と PA 6 細胞の共培養を行なった。8 日間の培養後、抗 NCAM 抗体、抗ネスチン抗体および非神経外胚葉細胞マーカーである E カドヘリンに対する抗体 (Takara 社製) を用いて細胞免疫染色を行なった。コントロールとして、BMP 4 未添加無血清培地を用いて共培養を行った。結果を図 5 A、B、C、D、E、F に示した。

【 0 1 7 1 】

また、BMP 4 添加無血清培地を用いて 8 日間培養した後、10% 牛胎児血清 (GIBCOBRL 社製) を含む Glasgow MEM 培地に交換し、さらに 3 日間培養した。培養細胞を 4% パラフォルムアルデヒド溶液を加えて 30 分間固定し、皮膚表皮細胞マーカーであるケラチン 14 に対する抗体 (Biomedica 社製) を用いて、細胞の免疫染色を行なった結果を、牛血清未添加培地を用いてさらに 3 日間培養した場合と比較して図 5 G、H、I に示した。

【 0 1 7 2 】

実施例 1 に示したように、BMP 4 未添加培地を用いた場合、ES 細胞由来のコロニーは抗 NCAM 抗体強陽性 (図 5 A)、抗ネスチン抗体強陽性 (図 5 B) であった。それに対し、E カドヘリン陽性のコロニーは少数 (18%) であった (図 5 C)。一方、BMP 4 添加無血清培地を用いた培養では ES 細胞由来のコロニーは抗 NCAM 抗体陰性 (図 5 D)、抗ネスチン抗体陰性 (図 5 E) であったが、E カドヘリン陽性のコロニーが高頻度に (98%) 出現した (図 5 F)。ケラチン 14 陽性のコロニーは、BMP 4 未添加培地を用いた場合全く出現しなかった (図 5 G) が、BMP 4 添加無血清培地を用いた培養では 34% の頻度で出現した (図 5 H)。BMP 4 添加無血清培地を用いて 8 日間培養した後、10% 牛胎児血清を含む Glasgow MEM 培地を用いてさらに 3 日間培養したものでは、ケラチン 14 陽性のコロニーの頻度 (47%) もコロニーのサイズも共に有意に増加した (図 5 I)。

なお、ES 細胞として代表的な 129 系マウス由来の CCE 細胞 (M. R. Kuehn ら; Nature, 326, 295, 1987; バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲット

ティング、ES細胞を用いた変異マウスの作製、羊土社、1995)を用いた共培養の場合にも上記と同様の結果が得られた。

【0173】

実施例3 胚性幹細胞をドーパミン作動性神経細胞へ分化させる活性を有するストローマ細胞の選択

PA6細胞、MEF細胞、STO細胞、NIH/3T3細胞、OP9細胞、CHO細胞、MDCK細胞、3Y1細胞あるいはCOS細胞(以下、各種細胞と呼ぶ)とES細胞EB5との共培養を行なった。

STO細胞はEvansらが記載している方法(M. J. Evansら; Nature, 292, 154, 1981)に従って培養した。NIH/3T3細胞はJainchillらが記載している方法(J. L. Jainchillら; J. Virol., 4, 549, 1969)に従って培養した。OP9細胞は仲野らが記載している方法(T. Nakanoら; Science, 272, 722, 1996)に従って培養した。CHO細胞はPuckらが記載している方法(T. T. Puckら; J. Exp. Med., 108, 945, 1985)に従って培養した。MDCK細胞はMisfeldtらが記載している方法(D. S. Misfeldtら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1212, 1976)に従って培養した。3Y1細胞はSandineyerらが記載している方法(S. Sandineyerら; Cancer Res., 41, 830, 1981)に従って培養した。COS細胞はGluzmanが記載している方法(Cell, 23, 175, 1981)に従って培養した。

【0174】

実施例1に記載の方法に従って、上述の各種細胞とES細胞EB5とを8日間共培養し、抗NCAM抗体で免疫染色し、陽性のES細胞由来のコロニーの割合を調べた。その結果、PA6細胞、OP9細胞、NIH/3T3細胞は、それぞれ95%、45%、10%の陽性率を示し、これら細胞はES細胞に対して有為な神経分化誘導活性を有することが分かった。一方、他の細胞は有意な神経分化誘導活性を示さなかった。

次に、パラフォルムアルデヒドで固定した上述の各種細胞とES細胞との共培養を行なった。

あらかじめ培地交換を行ない細胞密度がほぼコンフルエント状態にまで達した各種細胞を、PBS(-)で2回洗浄後、4%パラフォルムアルデヒド溶液を加

え 4℃ で 3 0 分間放置することで固定した。固定した細胞を P B S (-) 溶液で数回洗浄することで各種細胞を調製した。

【 0 1 7 5 】

調製した各種細胞をフィーダー細胞として用い、実施例 1 に記載の方法に従って E S 細胞 E B 5 との共培養を行なった。パラホルムアルデヒドで固定した細胞を用いた場合、P A 6 細胞、O P 9 細胞、N I H / 3 T 3 細胞、M E F 細胞、S T O 細胞との共培養で E S 細胞の神経細胞への分化が高率に観察されたが、3 Y 1 細胞、C O S 細胞、M D C K 細胞、C H O 細胞との共培養では観察されなかった。このことから、一群のストローマ細胞すなわち、P A 6 細胞、O P 9 細胞、N I H / 3 T 3 細胞、M E F 細胞、S T O 細胞が神経分化誘導活性を有すること、またその活性がパラホルムアルデヒドで固定しても残存することが分かった。また、M E F 細胞、S T O 細胞では、パラホルムアルデヒド処理により神経分化誘導活性を阻害する機構が解除されることが示唆された。

【 0 1 7 6 】

実施例 4 ストローマ細胞が有する、胚性幹細胞を神経細胞へ分化させる活性の解析

ストローマ細胞が有する胚性幹細胞を神経細胞へと分化させる活性を解析するために、多孔性フィルターを介して E S 細胞とストローマ細胞との共培養を行なった。

多孔性フィルターとして孔径 0 . 4 5 μ m の 6 穴用セルカルチャーインサート (商品番号 3 0 9 0、FALCON 社製) を用いた。P A 6 細胞をセルカルチャーインサートの中側に培養し、フィルター上に接着した P A 6 細胞を実施例 1 に記載の方法に従ってフィーダー細胞として調製した。

【 0 1 7 7 】

ゼラチンコートした 6 穴カルチャーディッシュ (FALCON 社製) に、実施例 1 に記載した無血清培地にけん濁した E S 細胞 E B 5 を 4 0 0 個 / 穴で播種し、上述の P A 6 細胞をフィーダー細胞として調整したセルカルチャー・インサートを穴に挿入して培養した。即ち、6 穴カルチャーディッシュ上に播種された E S 細胞 E B 5 と、フィーダー細胞としてセルカルチャー・インサート内に調製された P A

6細胞とをフィルター膜を介して共培養した。培養開始後4日目、6日目、7日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、37℃で5%の二酸化炭素を通気したCO₂インキュベーターにて8日間培養した。8日間培養後、培地を除き、4%パラフォルムアルデヒド溶液を加え30分間固定した。固定した細胞を、神経特異的なマーカーであるチューブリンに対する抗体(Babco社製)を用い、Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999)に記載の方法に従って免疫染色を行なった。チューブリン陽性のコロニーの出現割合をフィルターを介さないで培養した場合として比較して図6に示した。

【0178】

PA6細胞とES細胞EB5とをフィルターを介して共培養した場合(図6, フィルター)は25%のコロニーでチューブリン陽性となった。これはフィルターを介さないで培養した場合(図6, PA6)に比して1/3程度の効率であるが、PA6細胞なしでゼラチン上で培養した場合(図6、ゼラチン; 陽性率3%以下)に比して有意に高い神経分化が認められた。

【0179】

実施例5 ドーパミン作動性神経細胞に分化した胚性幹細胞の脳内移植の解析(その1)

実施例1に記載の方法に従い、PA6細胞をフィーダー細胞として用い、ES細胞EB5をBMP4未添加無血清培地で10日間培養した。すなわち、6cmの組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖したPA6細胞をフィーダー細胞として用い、このフィーダー細胞上にES細胞EB5を2000個/デッシュで播種し、4日目、6日目、8日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、37℃で5%の二酸化炭素を通気したCO₂インキュベーターにて10日間培養した。

培養の結果分化誘導された細胞を、細胞系譜トレーサーのDiI (Molecular Probe社製)を用い、添付資料に従って蛍光標識した。標識後、Papain Dissociation systemキット(Worthington社製)を用い、キット添付書類の方法に従ってパパイン酵素処理を室温で5分間行い、形成されたES細胞由来の各コロニーをほぼ一塊としてフィーダー細胞から分離した。なお、コロニー内の神経細胞に

ダメージを与えることを避けるため、分化誘導により形成された各コロニーをできるだけ一塊としてフィーダー細胞から分離し、移植に用いた。

キットに添付のパパイン阻害剤で酵素を失活させた後、15 mlの遠心チューブを用いて300 rpmで5分間遠心分離し、分化誘導したES細胞塊を回収した。6 cmディッシュ1枚分より回収された分化誘導ES細胞塊を5 μ lのN₂添加Glasgow MEM培地 (Gibco Lifetech社製) に浮遊させ、下記の移植に用いた。

【0180】

移植および薬物注入はCurrent Protocols in Neuroscience (John Wiley & Sons 社, 1999) 3. 10に記載の方法に従って行った。定位脳固定装置 (ナリシゲ社) にネンブタールで麻酔したC57BL/6マウスを固定し、The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Academic Press社製, 1997) に従って線条体を位置同定した。局所のドーパミン神経を破壊するために、6-hydroxydopamine(2,4,5-trihydroxyphenethylamine)hydrobromide (以下、「6-OHDA」という) をPBSに8 mg/mlで溶解し、これを微小ガラス管を用いて、片側の線条体の吻側と尾側に1カ所4 μ lずつ計2カ所注入した。一部のマウスでは3日後、注入側の錐体外路症状を確認した上で、針先平坦の26 Gハミルトンシリンジを用いて同側の線条体中央付近に上述の方法で神経細胞に分化誘導させたES細胞塊の浮遊液2 μ lを4分間かけて注入した。6-OHDA処理より8日後、マウス脳を灌流固定して組織標本作製し、それを、ドーパミン作動性神経のマーカーであるチロシン水酸化酵素に対する抗体 (Chemicon社製) とドーパミントランスポーターに対する抗体 (Chemicon社製) を用いて免疫染色を行った。

【0181】

ドーパミン神経の破壊のため6-OHDAで処理し細胞移植を行わなかった群では、同側の線条体内においてチロシン水酸化酵素およびドーパミントランスポーターを発現している神経組織は正常の40%以下になっていた (n=6)。それに対し、分化誘導したES細胞の移植を行った群ではDiI標識された移植片を中心に、同側の線条体内におけるチロシン水酸化酵素およびドーパミントランスポーターの発現領域が有為に回復し、全体で75%程度となり (n=6)、移植によ

るドーパミン作動性神経細胞の回復が観察された。

【 0 1 8 2 】

実施例 6 ドーパミン作動性神経細胞に分化した胚性幹細胞の脳内移植の解析（その 2）

実施例 1 に記載した方法に従い、P A 6 細胞をフィーダー細胞として用い、E S 細胞 E B 5 を B M P 4 未添加無血清培地で 8 日間培養した。すなわち、6 c m の組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖した P A 6 細胞をフィーダー細胞として用い、このフィーダー細胞上に E S 細胞 E B 5 を 2 0 0 0 個／デッシュで播種し、4 日目、6 日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、3 7℃で 5 %の二酸化炭素を通気した C O₂ インキュベーターにて 8 日間培養した。

その後さらに、2 m m o l / l グルタミン、1 m m o l / l ピルビン酸、0 . 1 m m o l / l M E M N o n - E s s e n t i a l A m i n o A c i d s 溶液、0 . 1 m m o l / l 2 - m e r c a p t o e t a n o l 、および N₂ (G I B C O B R L 社製、100 倍原液を 100 分の 1 添加) を添加した G l a s g o w M E M 培地（以下、N₂ 添加 G l a s g o w M E M 培地と表記する。）を用い 4 日間培養した。

培養後、M a n i p u l a t i n g t h e M o u s e E m b r y o A L a b o r a t o r y M a n u a l , S e c o n d E d i t i o n , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s (1 9 9 4) に記載の方法に従い 1 0 μ g / m l マイトマイシン C (M M C) を含む培地（上記 G l a s g o w M E M 培地）で 2 時間培養を行った。

【 0 1 8 3 】

上記培養の結果分化誘導された細胞を、P a p a i n D i s s o c i a t i o n s y s t e m キット（W o r t h i n g t o n 社製）を用い、添付書類の方法に従ってパパイン酵素処理を室温で 5 分間キット行い、形成された E S 細胞由来の各コロニーをほぼ一塊としてフィーダー細胞から分離した（なお、コロニー内の神経細胞に損傷を与えることを避けるため、分化誘導により形成された各コロニーをできるだけ一塊としてフィーダー細胞から分離した）。コロニーを分離後、コロニーを形成する細胞を細胞系譜トレーサーの D i I (M o l e c u l a r P r o b e 社製) を用い添付資料に従い、5 μ g / m l C M - D i I 、4 m g / m l グルコースを含む P B S 溶液中で室温 2 0 分間反応させることで蛍光標識した。標識後、N₂ 添加 G l a s g o w M E M 培地を用いて洗浄し、N

²添加Glasgow MEM培地 1 μ l に約 4×10^5 個の細胞が含まれるように調製し、下記の移植に用いた。

【0184】

移植および薬物注入はCurrent Protocols in Neuroscience (John Wiley & Sons 社、1999) 3. 10に記載の方法に従って行った。定位脳固定装置(ナリシゲ社製)にネンブータルで麻酔したC57BL/6マウスを固定し、The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Academic Press社、1997)に従って線条体を位置同定した。局所のドーパミン神経を破壊する6-OHDAをPBSに8 μ g/ μ lで溶解し、これを微小ガラス管を用いてThe Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Academic Press社製、1997)に従い片側の線条体に1カ所0.5 μ lずつ計3カ所[(A+0.5, L+2.0, V+3.0) (A+1.2, L+2.0, V+3.0) (A+0.9, L+1.4, V+3.0)]に注入した。一部のマウスでは3日後、注入側の錐体外路症状を確認した上で、針先平坦の26Gハミルトンシリンジを用いて同側の線条体中央付近(A+0.9, L+2.0, V+3.0)に上述の方法で神経細胞に分化誘導させたES細胞塊の浮遊液1 μ lを3分間かけて注入した。対照群には1 μ lのN₂添加Glasgow MEM培地を注入した。6-OHDA処理より14日後マウス脳を灌流固定し、ドーパミン作動性神経のマーカーであるチロシン水酸化酵素に対する抗体(Chemicon社製)とドーパミントランスポーターに対する抗体(Chemicon社製)を用いて免疫染色を行った。

【0185】

ドーパミン神経を破壊する6-OHDAで処理し細胞移植を行わなかった群では、同側の線条体内においてチロシン水酸化酵素およびドーパミントランスポーターを発現している神経組織は正常の15%以下になっていた(n=5)。それに対し、細胞移植を行った群ではDiI標識された移植片を中心に、同側の線条体内におけるチロシン水酸化酵素およびドーパミントランスポーターの発現領域が有意に回復し、全体で50%程度となった(n=5)。また、移植2週間後においても奇形腫テラトーマの形成は観察されなかった。

【0186】

実施例7 胚性幹細胞の神経系外胚葉細胞への分化過程の解析

実施例 1 に記載の方法に従い、P A 6 細胞をフィーダー細胞として用い、E S 細胞 E B 5 を B M P 4 未添加無血清培地で 8 日間培養した。すなわち、3 c m の組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖した P A 6 細胞をフィーダーとして用い、このフィーダー細胞上に E S 細胞 E B 5 を 2 0 0 個 / デッシュで播種し、4 日目、6 日目、7 日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、3 7 °C で 5 % の二酸化炭素を通気した C O ₂ インキュベーターにて 8 日間培養した。

【 0 1 8 7 】

8 日間培養後、実施例 1 に記載の方法に従って細胞を固定し、抗 N C A M 抗体、抗クラス III β チューブリン抗体、抗ネスチン抗体、プレシナプス特異的なマーカーであるシナプトフィジン (synaptophysin) に対する抗体 (Sigma 社製)、神経上皮細胞 (neuroepithelium) を認識する R C 2 抗体 (Developmental Studies Hybridoma Bank 社製)、中胚葉細胞を認識する M F 2 0 抗体 (Developmental Studies Hybridoma Bank 社製)、同じく中胚葉細胞においてその発現が観察されている P D G F 受容体 α および F 1 k 1 に対する抗体 (S.I.Nishikawa ら; Development, 125, 1747, 1998) を用いて E S 細胞 E B 5 と P A 6 細胞との共培養の結果出現したコロニーの免疫染色を行った。

【 0 1 8 8 】

E S 細胞 E B 5 と P A 6 細胞の共培養の結果出現したコロニーのほとんどは、実施例 1 で示した結果同様、抗 N C A M 抗体で染色された。また、抗体二重染色の結果、抗チューブリン抗体陽性のコロニーは抗シナプトフィジン抗体によって染色され、ネスチン陽性のコロニーは抗 R C 2 抗体によって染色された。一方、中胚葉細胞のマーカーである P D G F 受容体 α 、F 1 k 1、及び M F 2 0 に対する各種抗体で染色されるコロニーは全コロニー 2 % 以下とほとんど観察されなかった。従って、P A 6 細胞との共培養による E S 細胞の神経細胞誘導の過程には中胚葉系細胞の誘導は実質的に伴わないことが示唆された。

【 0 1 8 9 】

なお、E S 細胞として代表的な 1 2 9 系マウス由来の C C E 細胞 (M.R.Kuehn ら; Nature, 326, 295, 1987; バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲット

イング、ES細胞を用いた変異マウスの作製、羊土社、1995)を用いた共培養の場合にも上記と同様の結果が得られた。

【0190】

実施例8 胚性幹細胞の非神経系外胚葉細胞への分化過程の解析

実施例1に記載の無血清培地に0.5nmol/lのBMP4(R&D社製)を添加した培地を作製した。作製したBMP4添加無血清培地を実施例1で用いた無血清培地の代わりに用い、実施例1に記載した方法に従ってES細胞EB5とPA6細胞との共培養を行った。すなわち、3cmの組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖したPA6細胞をフィーダーとして用い、このフィーダー細胞上にES細胞を200個/デッシュで播種し、4日目、6日目、7日目に新鮮な培地を用いて培地交換を行い、37℃で5%の二酸化炭素を通気したCO₂インキュベーターにて8日間培養した。

【0191】

8日間培養後、実施例1に記載の方法に従って細胞を固定し、抗NCAM抗体、抗Eカドヘリン抗体、中胚葉細胞を認識するMF20抗体(Developmental Studies Hybridoma Bank社製)、同じく中胚葉細胞においてその発現が観察されているPDGF受容体 α およびFlk1に対する抗体(S.I.Nishikawaら; Development, 125, 1747, 1998)を用いてES細胞とPA6細胞の共培養の結果出現したコロニーの免疫染色を行った。

ES細胞とPA6細胞をBMP4添加無血清培地を用い共培養することで、実施例2で示した結果と同様、NCAM陰性Eカドヘリン陽性のコロニーが高頻度に出現した。一方、中胚葉細胞のマーカーであるPDGF受容体 α 、Flk1、及びMF20に対する各種抗体で染色されるコロニーは全コロニーの5%以下とほとんど観察されなかった。従って、BMP4存在下、PA6細胞との共培養によるES細胞の非神経系外胚葉細胞への誘導の過程には中胚葉系細胞の誘導は実質的に伴わないことが示唆された。

【0192】

なお、ES細胞として代表的な129系マウス由来のCCE細胞(M.R.Kuehnら; Nature, 326, 295, 1987; バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲット

イング、ES細胞を用いた変異マウスの作製、羊土社、1995)を用いた共培養の場合にも上記と同様の結果が得られた。

【0193】

実施例9 胚性幹細胞から分化誘導された神経細胞コロニーの解析

実施例1に記載の方法に従い、PA6細胞をフィーダー細胞として用い、ES細胞EB5をBMP4未添加無血清培地で12日間培養した。すなわち、3cmの組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖したPA6細胞をフィーダーとして用い、このフィーダー細胞上にES細胞を200個/デッシュで播種し、4日目、6日目、8日目、10日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、37℃で5%の二酸化炭素を通気したCO₂インキュベーターにて12日間培養した。

【0194】

10日間培養後、一部のデッシュの細胞を実施例1に記載の方法に従って固定し、チロシン水酸化酵素、VAchT、GAD、セロトニンに対する抗体を用いてES細胞EB5とPA6細胞との共培養の結果出現したコロニーの免疫染色を行った(n=200)。

ES細胞EB5とPA6細胞との共培養の結果出現したコロニーのうち、92%がドーパミン作動性神経細胞のマーカであるチロシン水酸化酵素陽性、43%がGABA作動性神経細胞のマーカであるGAD陽性、28%がコリン作動性神経細胞のマーカであるVAchT陽性、7%がセロトニン陽性であった。

【0195】

引き続き、残りのデッシュの培養を続け、12日間培養後に実施例1に記載の方法に従って細胞を固定し、クラスIIIβチューブリン、ネスチン、チロシン水酸化酵素に対する抗体を用いてES細胞EB5とPA6細胞との共培養の結果出現したコロニーの免疫染色を行った。また、コロニーを形成する全細胞の数を測定する為に、Molecular Probe社のキットYOYO-1を用いた核染色を行った。核染色後、ES細胞EB5とPA6細胞の共培養の結果出現したコロニー(n=20)をランダム選択し、共焦点顕微鏡で観察する事によって染色された細胞数をカウントした(n=5050)。

【 0 1 9 6 】

カウントした全細胞のうち、クラスIII β チューブリン陽性細胞、ネスチン陽性細胞、チロシン水酸化酵素陽性細胞の割合はそれぞれ、 $52 \pm 9\%$ 、 $47 \pm 10\%$ 、 $30 \pm 4\%$ であった。

なお、ES細胞として代表的な129系マウス由来のCCE細胞(M.R.Kuehnら; Nature, 326, 295, 1987; バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲッティング、ES細胞を用いた変異マウスの作製、羊土社、1995)を用いた共培養の場合にも上記と同様の結果が得られた。

【 0 1 9 7 】

実施例10 胚性幹細胞から分化誘導されたドーパミン作動性神経細胞の解析(その1)

実施例1に記載の方法によって、胚性幹細胞から分化誘導される神経細胞の性質をより詳細に解析する為に、中脳のドーパミン作動性神経細胞のマーカーであるNurr1 (R.H.Zetterstromら; Science, 276, 248, 1997) およびPt x 3 (M.P.Smidtら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 13305, 1997) の該分化誘導に伴う発現変化をRT-PCR法にて調べた。

細胞の調製は以下のように行った。

【 0 1 9 8 】

実施例1に記載の方法に従い、PA6細胞をフィーダー細胞として用い、ES細胞EB5をBMP4未添加無血清培地で12日間培養した。すなわち、9cmの組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖したPA6細胞をフィーダーとして用い、このフィーダー細胞上にES細胞EB5を 5×10^4 個/デッシュで播種し、4日目、6日目、8日目、10日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、37℃で5%の二酸化炭素を通気したCO₂インキュベーターにて12日間培養した。

また、実施例1で示したES細胞培養用培地を用い、9cmの組織培養用デッシュにES細胞EB5を 5×10^4 個/デッシュで播種し、4日目、6日目、8日目、10日目に新鮮な培地を用いて培地交換を行い、37℃で5%の二酸化炭素を通気したCO₂インキュベーターにて12日間培養した細胞を対照として調製し

た。

【0199】

上記調製した分化誘導した細胞および対照ES細胞における、Nurr1およびPt x 3のmRNAレベルでの発現を検出する為に、マウス胎生12日の胎児頭部をポジティブコントロールとして用い、笹井らによって報告されている方法(Y.Sasaiら; Nature, 376, 333, 1995)に準じてRT-PCRを行った。すなわち、細胞を調製したデッシュおよび胎生12日の胎児頭部から、Trizol試薬(GIBCO BRL社製)を用い添付マニュアルに従って全RNAを調整し、SUPER SCRIPT Preamplification System for first strand cDNA Synthesis (GIBCO BRL社製)を用いてcDNAを合成した。合成したcDNAを滅菌水を用いて50倍に希釈した溶液を材料にして常法により反応液[10mmol/l Tris-HCl(pH8.3), 50mmol/l KCl, 1.5mmol/l MgCl₂, 0.2mmol/l dNTP, 0.2μmol/l遺伝子特異的プライマー(配列表に記載), 1 unit recombinant Ex Taq polymerase (Takara社製)]を調製後、94℃で3分間反応させ、次いで94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で1分間のサイクルを30サイクル反復し、最後に72℃で7分間反応させ、4℃で一晩保存する条件でPCRを行った。該反応液をアガロースゲル電気泳動し用いたプライマーに特異的なDNAバンドの濃さを比較することで、各種因子の発現量の半定量的な比較を行った。

【0200】

なお、配列番号1及び2で表される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをNurr1特異的プライマーとして、配列番号3及び4で表される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをPt x 3特異的プライマーとして、配列番号5及び6で表される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをG3PDH特異的プライマーとして各々用いた。Pt x 3特異的プライマーを用いてPCRを行う場合にはDM SOを終濃度5%になるように反応液中に添加して行った。

【0201】

ES細胞とPA6細胞を12日間共培養した結果、実施例1で示した結果と同様に神経細胞様のコロニーが出現した。また、この分化誘導されたコロニーを含む細胞集団では、ポジティブコントロールと同様に、有為なNurr1およびP

t x 3 の発現が観察された (図 7 : E S + S D I A) 。一方、対照とした E S 細胞では N u r r 1 および P t x 3 の発現が検出されなかった (図 7 : E S) 。なお、9 c m の組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖した P A 6 細胞を対照に上述の条件で R T - P C R を行っても、N u r r 1 および P t x 3 の発現は検出されなかった。従って、P A 6 細胞との共培養によって胚性幹細胞が神経細胞に分化誘導されるに伴い中脳のドーパミン作動性神経細胞のマーカである N u r r 1 および P t x 3 の発現が上昇していることが分かった。

【0202】

なお、E S 細胞として代表的な 129 系マウス由来の C C E 細胞 (M.R.Kuehn ら; Nature, 326, 295, 1987; バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲットイング、E S 細胞を用いた変異マウスの作製、羊土社、1995) を用いた共培養の場合にも上記と同様の結果が得られた。

【0203】

実施例 1 1 胚性幹細胞から分化誘導されたドーパミン作動性神経細胞の解析 (その 2)

実施例 1 に記載の方法によって、胚性幹細胞から分化誘導される神経細胞の性質をより詳細に解析する為に、ドーパミンの生産量を常法 (K.Inoue & J.G.Kenimer ら; J. Biol. Chem., 263, 8157, 1988; 今泉美佳、熊倉鴻之助; 実験医学別冊 神経生化学マニュアル、p191-200, 1990) に従い H P L C を用いて定量した。

細胞からの測定試料の調製は以下のように行った。

【0204】

実施例 1 に記載の方法に従い、P A 6 細胞をフィーダー細胞として用い、E S 細胞 E B 5 を B M P 4 未添加無血清培地で 8 日間培養した。すなわち、9 c m の組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖した P A 6 細胞をフィーダーとして用い、このフィーダー細胞上に E S 細胞を 5×10^4 個 / デッシュで播種し、4 日目、6 日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、37℃で 5 % の二酸化炭素を通気した C O ₂ インキュベーターにて 8 日間培養した。その後さらに、2 mmol/l グルタミン、1 mmol/l ピルビン酸、0.1 mmol/l MEM Non-Essent

ial Amino Acids溶液、0.1 mmol/l 2-メルカプトエタノール、0.2 mmol/l アスコルビン酸、0.1 mmol/l Tetrahydrobiopterin、およびN₂を添加したGlasgow MEM培地を用い6日間培養した。培養後、緩衝液HBSS (GIBCO BRL社製) を用いて2回洗浄し、洗浄した細胞を56 mmol/l KClを含むHBSS溶液中で15分間培養した。15分後、培養液を回収し、終濃度が0.4 mol/l Perchloric acidおよび5 mmol/l EDTAとなるように調整し、測定試料として-80℃で保存した。

【0205】

上述のES細胞とPA6細胞との共培養により約100万細胞程度のES細胞由来分化細胞が出現した。また、出現した細胞を用いて調整した測定試料中のドーパミンの定量は、逆相-HPLCを用いたMonoamine Analysis System (Eicom Corp., Kyoto, Japan) を用いて行った。結果を図8に示した。

PA6細胞との共培養により胚性幹細胞から分化した神経細胞は、56 mmol/l KClの脱分化刺激により有為な量のドーパミンを遊離していることが分かった [7.7 pmol/10⁶細胞 (ES細胞由来分化細胞)]。また、ドーパミン派生物質であるDOPAC (3,4-dihydroxyphenylacetic acid) およびHVA (homovanillic acid) も、有為な量が検出された [それぞれ、2.5 pmol/10⁶細胞 (ES細胞由来分化細胞) および4.0 pmol/10⁶細胞 (ES細胞由来分化細胞)]。

従って、PA6細胞との共培養によって胚性幹細胞から分化誘導されたドーパミン作動性神経細胞は、ドーパミンを産生し機能的な神経として作用し得る能力を有していることがインビトロにおいても示唆された。

【0206】

実施例12 原始外胚葉を構成する細胞のドーパミン作動性神経細胞への分化

ES細胞EB5の代わりにマウス胎生6日目の原始外胚葉 (Pre-streak epiblast) から単離した細胞を用い、実施例1あるいは2に記載した方法に従ってPA6細胞との共培養を行った。

マウス胎生6日目の原始外胚葉を構成する細胞の単離および培養は、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) に記載の方法に従って行った。

実施例 1 に記載の方法に従い、P A 6 細胞をフィーダー細胞として用い、単離した胚細胞を BMP 4 未添加無血清培地で 8 日間培養した。すなわち、3 c m の組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖した P A 6 細胞をフィーダーとして用い、このフィーダー細胞上に単離した原始外胚葉細胞を 200 個/デッシュで播種し、4 日目、6 日目、7 日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、37℃で 5% の二酸化炭素を通気した CO₂ インキュベーターにて 8 日間培養した。

【0207】

また、実施例 1 で用いた無血清培地に 0.5 nmol/l の BMP 4 (R&D 社製) を添加した培地を用い、実施例 1 に記載した方法に従って単離した胚細胞と P A 6 細胞との共培養を行った。すなわち、3 c m の組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖した P A 6 細胞をフィーダーとして用い、このフィーダー細胞上に E S 細胞を 200 個/デッシュで播種し、4 日目、6 日目、7 日目に新鮮な培地を用いて培地交換を行い、37℃で 5% の二酸化炭素を通気した CO₂ インキュベーターにて 8 日間培養した。

8 日間培養後、実施例 1 に記載の方法に従って細胞を固定し、抗 NCAM 抗体、抗チューブリン抗体、抗ネスチン抗体、抗 E カドヘリン抗体を用いて単離した胚細胞と P A 6 細胞の共培養の結果出現したコロニーの免疫染色を行った。

単離した原始外胚葉の胚細胞を用いた場合でも、E S 細胞 E B 5 を用いて行った実施例 1 および 2 の結果と同様の結果を得、神経系細胞および表皮系細胞の出現が観察された。

【0208】

実施例 13 ストローマ細胞が有する、胚性幹細胞を外胚葉系の細胞に分化誘導させる因子の回収

実施例 3 に記載の方法に従い、パラフォルムアルデヒド固定した P A 6 細胞をフィーダー細胞として用い、E S 細胞 E B 5 を BMP 4 未添加無血清培地で 8 日間培養した。この際、P A 6 細胞をヘパリン (GIBCO BRL 社製) を含む培地で培養した場合 (以下、「ヘパリン処理」という) と、ヘパリン無添加の培地で培養した場合との比較を行った。すなわち、3 c m の組織培養用デッシュ上でほぼコ

ンフルエントにまで増殖した P A 6 細胞を 2 0 0 ng/ml ヘパリンを含む培地で 2 日間培養したデッシュと、ヘパリン無添加の培地で 2 日間培養したデッシュを調整し、P B S (-) で 2 回洗浄後パラフォルムアルデヒド固定を行い、これらパラフォルムアルデヒド固定した P A 6 細胞上に E S 細胞 E B 5 を 2 0 0 個 / デッシュで播種し、4 日目、6 日目、7 日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、3 7 °C で 5 % の二酸化炭素を通気した C O ₂ インキュベーターにて 8 日間培養した。

【 0 2 0 9 】

8 日間培養後、実施例 1 に記載の方法に従って細胞を固定し、抗 N C A M 抗体、抗チューブリン抗体、抗ネスチン抗体を用いて E S 細胞 E B 5 と P A 6 細胞との共培養の結果出現したコロニーの免疫染色を行った。

ヘパリン処理を施さなかった P A 6 細胞をフィーダー細胞として用いた場合には、実施例 3 で示した結果同様、9 0 % 近くの E S 細胞由来のコロニーが N C A M 陽性であり、E S 細胞の神経細胞への分化が高率で観察された。一方、ヘパリン処理を施した P A 6 細胞をフィーダー細胞として用いた場合には E S 細胞の神経細胞への有為な分化は観察されなかった。このことより、ストローマ細胞が有する胚性幹細胞を外胚葉系の細胞に分化誘導する活性は、W n t s 分子で観察されている現象 (R . S . Bradley & A . M . C . Brown ; E M B O J . , 9 , 1569 , 1990) と同様に、ストローマ細胞をヘパリンを含む培地で培養することで培養上清中に回収できる事が示唆された。

【 0 2 1 0 】

【発明の効果】

本発明により、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を選択的且つ効率的に分化誘導する方法、該分化誘導した細胞並びにそれらの用途が提供される。

【 0 2 1 1 】

【配列表のフリーテキスト】

配列番号 1 - 人工配列の説明 : 合成 D N A

配列番号 2 - 人工配列の説明 : 合成 D N A

配列番号 3 - 人工配列の説明 : 合成 DNA

配列番号 4 - 人工配列の説明 : 合成 DNA

配列番号 5 - 人工配列の説明 : 合成 DNA

配列番号 6 - 人工配列の説明 : 合成 DNA

【 0 2 1 2 】

【配列表】

Sequence Listing

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> NOVEL DIFFERENTIATION INDUCING PROCESS OF EMBRYONIC STEM CELL TO ECTODERMAL CELL AND ITS USE

<130> P-34670-1

<150> JP 2000-144059

<151> 2000/05/16

<160> 6

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 1

tgaagagagc ggacaaggag atc

23

【0213】

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 2

tctggagtta agaaatcgga gctg

24

【0214】

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 3

aggacggctc tctgaagaa

19

【0215】

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

ttgaccgagt tgaaggcgaa

20

【 0 2 1 6 】

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

gaccacagtc catgccatca ct

22

【 0 2 1 7 】

<210> 6

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 6

tccaccaccc tgttgctgta g

21

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図1は、ES細胞EB5とPA6細胞との共培養の結果出現したコロニーを、(A) NCAM、(B) チューブリン、(C) ネスチンに対する抗体で染色した結果を示した顕微鏡写真である。

【図2】

図2は、ES細胞EB5とMEF細胞との共培養の結果出現したコロニーを抗NCAM抗体で染色した結果を示した顕微鏡写真である。

【図3】

図3は、ES細胞EB5とPA6細胞との共培養の結果出現したコロニーをチロシン水酸化酵素に対する抗体で染色した結果を示した顕微鏡写真である。

【図4】

図4は、ES細胞EB5とPA6細胞との共培養の結果出現したコロニーの中で各種マーカー陽性のコロニーの割合を経時的に示したグラフである。

【図5】

図5は、BMP4無添加でES細胞EB5とPA6細胞との共培養の結果出現したコロニーの中で、(A) NCAMに対する抗体、(B) ネスチンに対する抗体、(C) Eカドヘリンに対する抗体および(G) ケラチン14に対する抗体を用いて染色した結果、及びBMP4添加でES細胞とPA6細胞との共培養の結果出現したコロニーの中で、(D) NCAMに対する抗体、(E) ネスチンに対する抗体、(F) Eカドヘリンに対する抗体および(H、I) ケラチン14に対する抗体を用いて染色した結果を示した顕微鏡写真である。

【図6】

図6は、PA6細胞とES細胞EB5を、フィルターを介して共培養した場合(フィルター)、フィルターを介さないで共培養した場合(PA6)、およびPA6細胞なしにES細胞EB5をゼラチン上で培養した場合(ゼラチン)とで、出現したコロニーをチューブリンに対する抗体を用いて染色した結果を示したグラフである。

【図7】

図7は、ES細胞EB5とPA6細胞との共培養の結果出現した分化細胞中のNurr1、Pt x 3およびG3PDHの発現量をRT-PCR法にて解析した

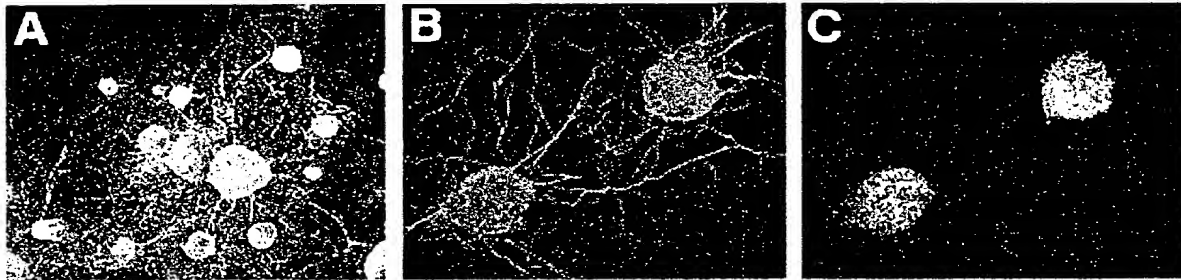
結果を示した図である。胎生12日のマウス頭部の細胞（図中、Embryoと表記）、PA6細胞と12日間共培養したES細胞EB5（図中、ES+SDIAと表記）および対照として12日間培養したES細胞EB5（図中、ESと表記）を材料として、RT-PCRを行いアガロース電気泳動にて解析した結果を示した。

【図8】

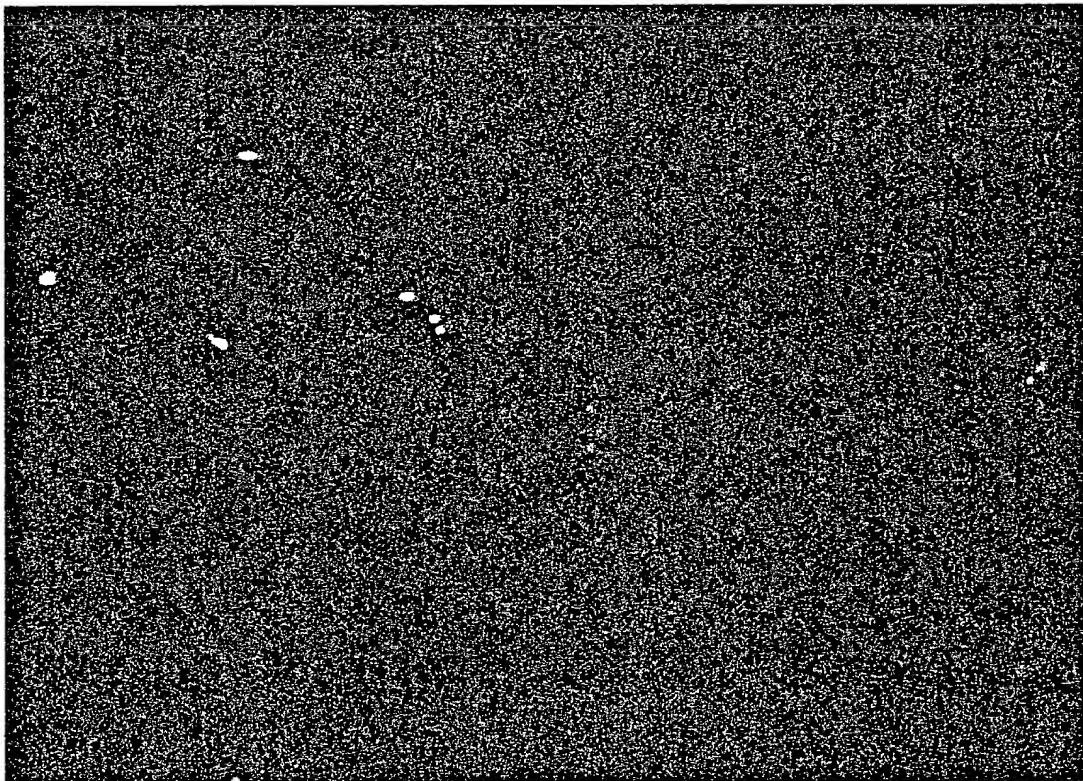
図8は、ES細胞EB5とPA6細胞との共培養の結果出現した分化細胞を脱分化刺激することで、培地中に分泌された成分をHPLC法にて解析した結果を示したクロマトグラフである。対照として、フィーダー細胞として用いたPA6細胞のみに対して同様の脱分化刺激を与えた際に分泌された成分の解析を行った結果を右上のクロマトグラフに示した。

【書類名】 図面

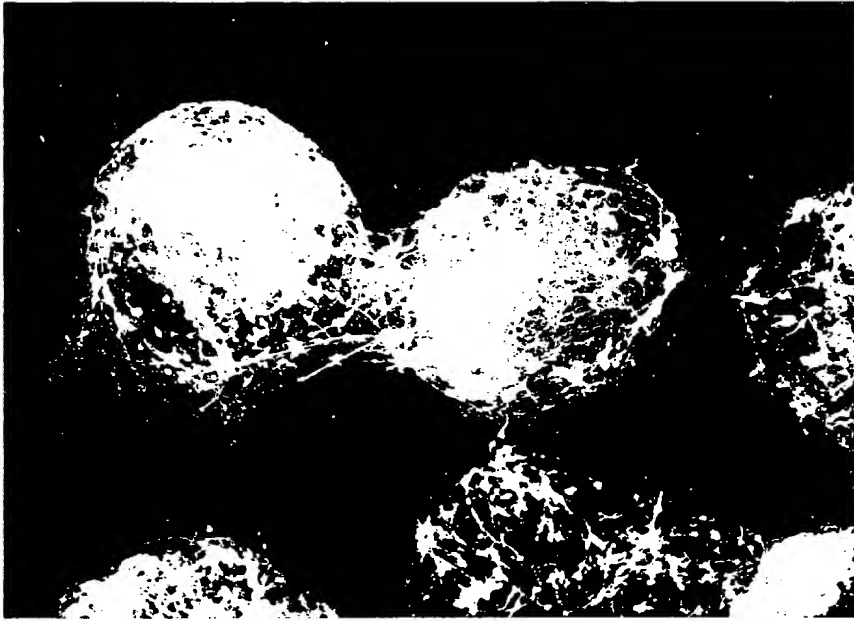
【図1】



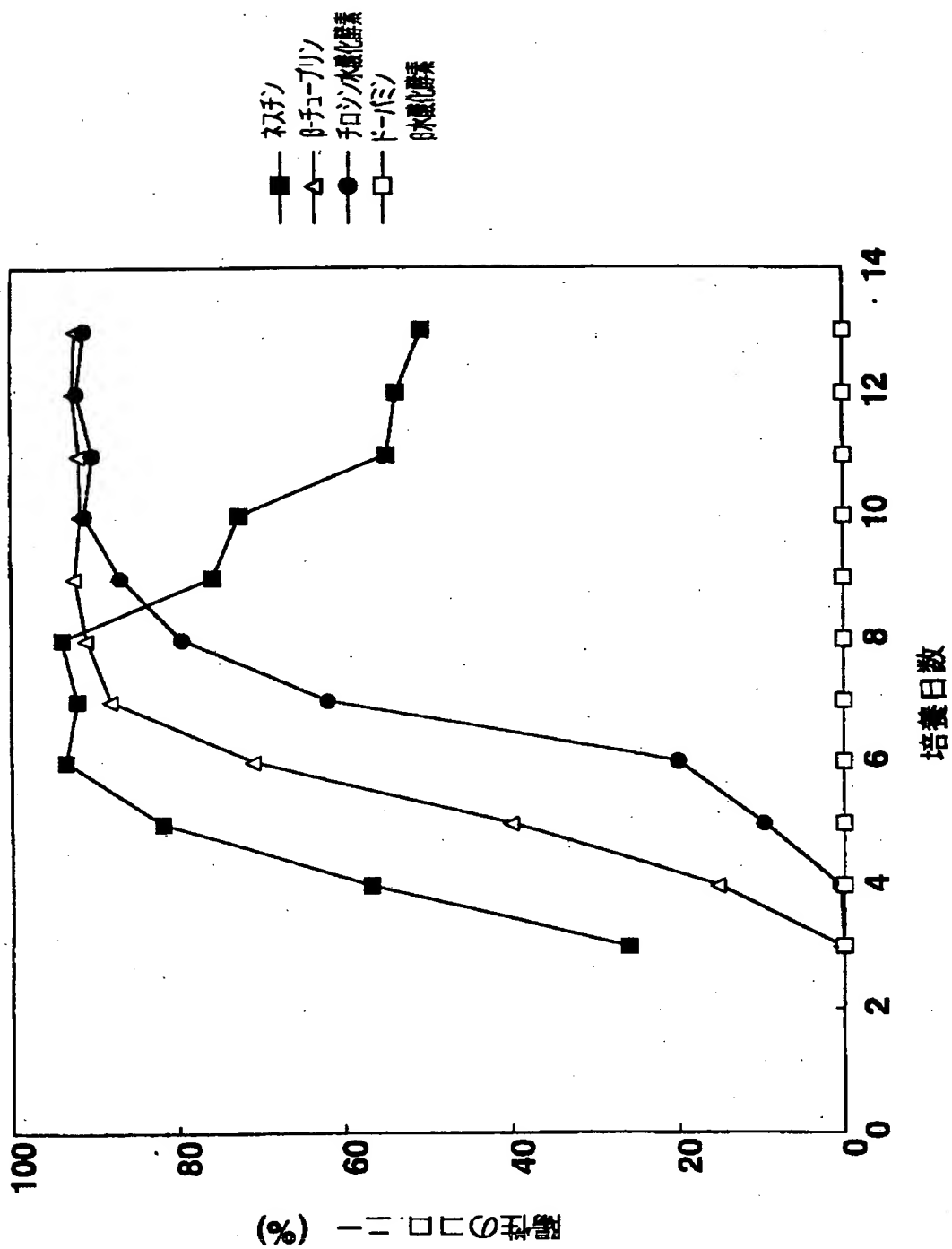
【図2】



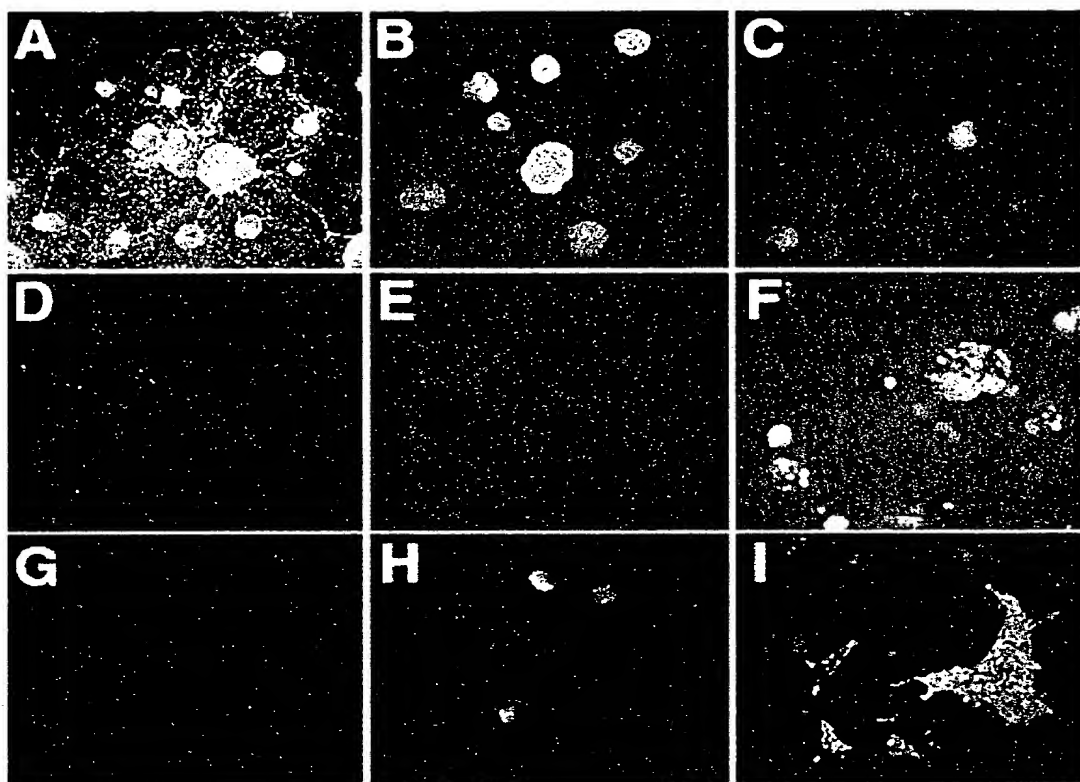
【図3】



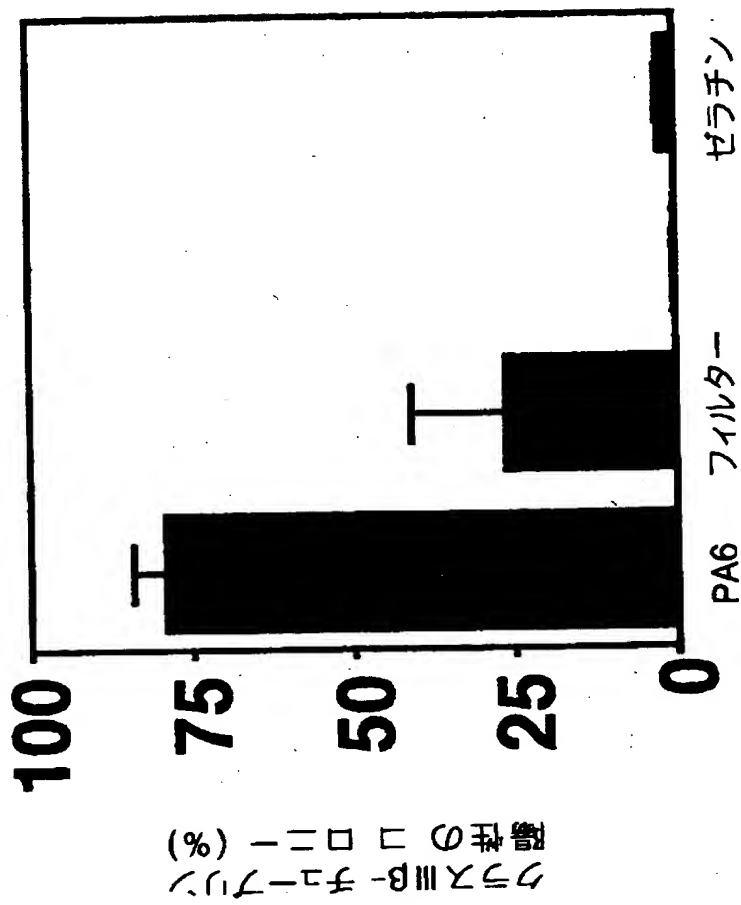
【図4】



【図5】



【図6】

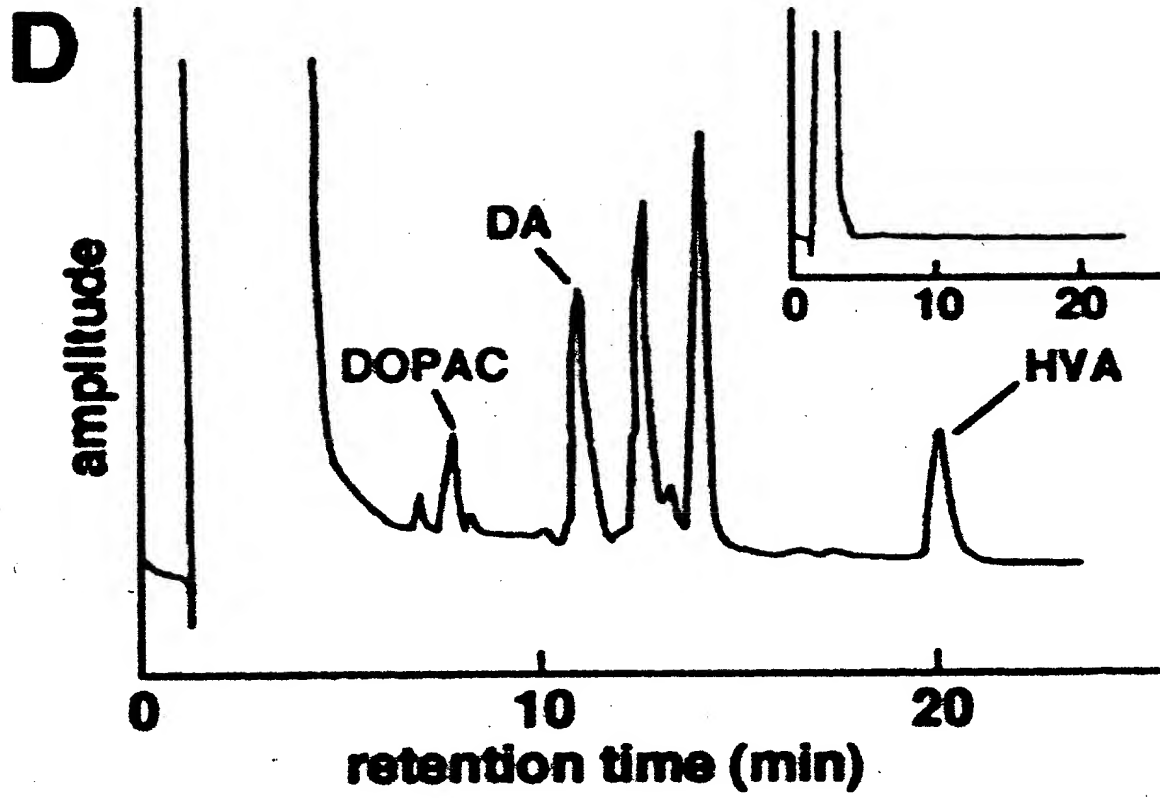


【図7】

C



【図8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

細胞及び臓器移植医療に利用可能であり、胚性幹細胞から外胚葉および外胚葉由来の細胞を選択的且つ効率的に分化誘導する方法、該分化誘導した細胞、並びにこれらの用途、また、該分化誘導する方法に用いる培地、該分化誘導する方法に用いるストローマ細胞を特異的に認識する抗体の取得方法、それにより取得される抗体、該抗体が認識する抗原の取得方法、それにより取得される抗原、並びにこれらの用途を提供すること。

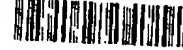
【解決手段】

本発明は、胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程を含む、胚性幹細胞を外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞に分化誘導する方法、及びそれらの用途に関する。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書
【整理番号】 P-34670-1
【提出日】 平成12年11月 1日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2000-290819
【補正をする者】
 【識別番号】 000001029
 【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100105647
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小栗 平
 【電話番号】 03-5561-3990
【手続補正 1】
 【補正対象書類名】 特許願
 【補正対象項目名】 提出物件の目録
 【補正方法】 追加
 【補正の内容】
 【提出物件の目録】
 【物件名】 委任状 1

(A)10002C80052



委任状

平成12年9月27日

私（私ども）は、

識別番号100105647（介理士）小栗 昌平、
 識別番号100105474（介理士）本多 弘徳、
 識別番号100108589（弁理士）市川 利光、
 識別番号100115107（弁理士）高松 猛、
 識別番号100090343（弁理士）栗宇 百合子氏
 を以て代理人として下記事項を委任します。

1. 特願2000-290819

に関する手続き

2. 上記出願に基づく特許法第41条第1項又は実用新案法第8条第1項の規定による優先権の主張及びその取下げ

1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ

1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求

1. 上記出願に関する補正の却下の決定に対する審判の請求

2. 上記出願に係る特許権、実用新案権、意匠権、商標権又は防護標章登録に基づく権利及びこれらに関する権利に関する手続並びにこれらの権利の放棄

1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護標章）登録に対する登録異議の申立てに関する手続

1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録、意匠登録、商標登録、防護標章登録又は商標（防護標章）更新登録に対する無効審判の請求に関する手続

2. 上記出願に係る特許権に関する訂正の審判の請求

2. 上記出願に係る商標登録に対する取り消しの審判の請求に関する手続

2. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ

2. 上記項目に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと

2. 上記各項の手続を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

1. 特願2000-144059に基づく特許法第41条第1項又

は平成 年実用新案登録願第 号に基づく実用新案法第

8条第1項の優先権主張若しくはその取下げに関する事項一切

住所（居所） 東京都千代田区大手町一丁目6番1号

氏名（名称） 協和醸酵工業株式会社

代表者 平 田 正



認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-290819
受付番号	10002080062
書類名	手続補正書
担当官	小菅 博 2143
作成日	平成12年12月12日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】	000001029
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町1丁目6番1号
【氏名又は名称】	協和醗酵工業株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】	100105647
【住所又は居所】	東京都港区赤坂一丁目12番32号 アーク森ビル28階栄光特許事務所

【氏名又は名称】	小栗 昌平
----------	-------

【提出された物件の記事】

【提出物件名】	委任状（代理権を証明する書面）	1
---------	-----------------	---

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001029]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
氏 名 協和醗酵工業株式会社
2. 変更年月日 2003年 4月25日
[変更理由] 名称変更
住 所 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
氏 名 協和醗酵工業株式会社